

ÜBER DIE VERWENDBARKEIT
VERSCHIEDENER ZYMOSAN-PRÄPARATIONEN
ZUR MESSUNG DES SERUMPROPERDINSPIEGELS

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Hohen Medizinischen Fakultät der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

vorgelegt von

KLAUS HOEBBEL

aus Idar-Oberstein



MAINZ
1962

Dekan: Professor Dr. Dr. K. Lang

Referent: Professor Dr. H. Kliewe

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Februar 1962

GESAMTHERSTELLUNG:

DITTERS BÜRODIENST, MAINZ, Augustinerstraße 64-66

MEINEN ELTERN

GEWIDMET



Digitized by the Internet Archive
in 2026

DISPOSITION

I. Einleitung:

Das Properdinsystem mit besonderer Berücksichtigung seiner Beziehungen zu Polysacchariden

A. Properdin (P):

1. physikalisch-chemische Eigenschaften
2. biologische Eigenschaften
3. Bedeutung in der Klinik
4. serologische Eigenschaften
5. Bestimmungsmethoden

B. Zymosan (Zy):

1. Problemstellung der Arbeit
2. Eigenschaften des Zy und Herstellungsverfahren

II. Methodik:

Die Prüfung verschiedener Zymosane auf ihre Brauchbarkeit zur Properdinbestimmung

A. Theorie der Properdin-Titration mittels Zymosan

1. Allgemeines
2. Reagenzien
3. Modifikationen der Zymosan-Methode

B. Theorie der Prüfung des Zymosans

C. Praxis der Prüfung des Zymosans

1. Prüfung des sogenannten "Originalserums"
2. Prüfung der Serum-Zymosan-Suspensionen auf einige physikalische Eigenschaften
 - a) pH-Wert
 - b) Bakteriengehalt
 - c) antikomplementäre Aktivität
 - d) Korngrößen und Korngrößenverteilung
3. Prüfung der Serum-Zymosan-Suspensionen auf serologische Eigenschaften
 - a) Herstellung von RP-Serum
 - b) Herstellung von R_3 -Serum
 - c) Brauchbarkeit zur Properdin-Titration

III. Ergebnisse:

Beschreibung und Auswertung. Tabellen 1-6 und Abbildungen 1-12

IV. Diskussion:

Die Beziehungen zwischen chemisch-physikalischen Eigenschaften der Zymosane und ihrer Reaktivität gegen Properdin und C'_3 .

Die Bedeutung der Aktivierung. - Die verschiedenen Prüfmethode
für Zymosan. - Die Signifikanz der Properdin-Titerhöhe

V. Zusammenfassung

VI. Literatur

I. EINLEITUNG

- A. Die Erforschung der unspezifischen Resistenz des Organismus wurde in entscheidendem Maße durch die Entdeckung des Properdins (P) im Jahre 1954 gefördert (44). In den letzten Jahren sind auch im deutschsprachigen Schrifttum ausführliche zusammenfassende Arbeiten über die Bedeutung dieses Faktors erschienen (8, 21, 25 a, 28, 55, 56). Wir haben uns in der folgenden Arbeit mit der Messung des Properdins beschäftigt. Um aber unsere Fragestellung deutlich werden zu lassen, müssen einige Bemerkungen über die physikalisch-chemischen und biologischen Eigenschaften dieses Stoffes vorausgeschickt werden.
1. Properdin ist ein Eiweißkörper. Seine Löslichkeitsbedingungen sind die eines Euglobulins, sein Molekulargewicht beträgt $1,2 \cdot 10^6$ (44). Elektrophoretisch zeigt der Hauptanteil die Wanderungsgeschwindigkeit des Gamma-Globulins; andere Autoren hingegen beschrieben eine auch immunoelektrophoretisch festgestellte Verwandtschaft zu den Beta-Globulinen (53). Nach ISLIKER und Mitarbeitern (26) ist das Properdin ein aus verschiedenen Einheiten, die über SH-HS-Brücken verbunden sein können, aufgebautes Makro-Beta-Globulin. Es läßt sich zerlegen in Anteile mit 20-26 S und solche mit nur 6-7 S. Die Sedimentationskonstante von S = 27 (nach PILLEMER und Mitarbeitern (44)) bzw. 23-25 (nach ISLIKER und LINDER (27)) zeigt es als schwerstes Eiweißmolekül im Serum. Im normalen Humanserum beträgt sein Gehalt 2 mg/100 ml (27). Geringe pH-Änderungen lassen seine Stabilität unverändert (55). P bleibt im Serum für 1 - 2 Tage bei + 1° C völlig aktiv. Es erleidet keinen Wirkungsverlust bei größerer Kälte und verträgt Frieren und Auftauen.
2. Bei der Besprechung der biologischen Eigenschaften muß zuerst erwähnt werden, daß P allein keinerlei Wirkung in vivo entfalten kann. PILLEMER und Mitarbeiter (44) fanden, daß für die biologische Aktivität des P Zusatzfaktoren notwendig sind, nämlich die 4 Anteile des menschlichen Serumkomplexes und Mg^{++} -Ionen. Man spricht deshalb auch vom Properdin-Komplex-System. Auf Einzelheiten dieses Systems wird weiter unten eingegangen.
- Bisher sind folgende biologische Eigenschaften des P-Systems bekannt:
- a) seine Bakterizidie.
- Tierexperimentell ließ sich ein Zusammenhang zwischen P-Spiegel und Infektionsresistenz nachweisen:
- Nach parenteraler Verabfolgung des unlöslichen Hefepolysaccharids Zymosan (Zy) (45, 48) sowie von Bakterienzellwänden (50 a), Bakterien-

endotoxinen (33, 34) und anderen hochmolekularen Polysacchariden (46) wurde zunächst in der Regel (Ausnahmen s. bei ISLIKER (10)) ein kurzfristiges Absinken des P-Titers beobachtet, das von einem Anstieg über die Norm gefolgt wurde. Mit virulenten Bakterienstämmen infizierte Tiere waren in der Phase des niedrigen Titers auffallend infektanfällig, dagegen erhöht resistent nach Anstieg über den normalen Titer hinaus. Eine zeitliche Übereinstimmung zwischen Titeranstieg und Resistenzerhöhung konnte allerdings von LANDY und PILLEMER (33, 34) nicht immer gefunden werden. Der bakterizide Effekt könnte möglicherweise auf einer Ausschaltung des P durch Bindung an die oben erwähnten Stoffe beruhen (26), eine Ansicht, die experimentell durch Versuche von WARDLAW und PILLEMER (63) gestützt wurde. Die Ursache der Bakterizidie des Serums ist aber offenbar nicht allein in seinem P-Gehalt zu suchen. Genauere Untersuchungen (61, 62) ergaben nämlich, daß nur gramnegative Keime, in bevorzugtem Maße Enterobakterienstämme, gegenüber P empfindlich sind. Grampositive Bakterien zeigen keinerlei Sensibilität. Dies weist darauf hin, daß das P-System lediglich ein Faktor der unspezifischen Infektabwehr des Organismus ist, der sicherlich noch durch andere synergistische Abwehrmaßnahmen hinsichtlich seiner Bakterizidie ergänzt wird (28);

b) seine Virizidie.

Als antiviraler Faktor wurde das P-System von WEDGWOOD, GINSBERG, SEIBERT und PILLEMER (64) untersucht. Diese Autoren konnten nachweisen, daß beim Newcastle-Disease-Virus der hitzelabile Antivirus-Serumfaktor im normalen Menschen Serum mit der Eliminierung von P verschwindet. Durch Zugabe von P gewann dieses inaktivierte Serum seine Anti-Viruswirkung wieder zurück. Über die Wirkung auf Herpes-simplex-Virus berichteten FINKELSTEIN, ALLEN und SULKIN (11);

c) seine Einwirkung auf Erythrozyten.

In bestimmter Weise veränderte Erythrozyten, so z. B. mit Tannin vorbehandelte oder solche von Patienten mit paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie, fallen der Lyse des P-Systems anheim (23, 24);

d) seine phageninaktivierende Wirkung.

Die schon früher gemachte Beobachtung, daß Humanserum eine Inaktivierung von Bakterienviren (Phagen) herbeiführte, fand durch die Entdeckung des P eine Deutung (60);

e) seine Wirkung auf Rickettsien.

Von JANCZURA (30) wird berichtet, daß nach Infektionen von Ratten mit *Rickettsia mooseri* ein P-Titerabfall eintritt;

f) sein Einfluß auf Protozoen.

GRÖNROOS (19) ist der Ansicht, daß neben den spezifischen Antikörpern das P-System notwendig ist, um die Zellwände von Toxoplasmen irreversibel zu zerstören;

g) seine Opsonin-Aktivität.

Nach WRIGHT und DOUGLAS (67) sind Opsonine thermolabile Substanzen, die die Phagozytose im normalen Serum anregen. Sie verändern die Bakterien derart, daß diese durch Granulozyten phagozytiert werden können.

NANNI (38) Beobachtungen sprechen für die Möglichkeit, daß P der Opsoninfraktion entspricht. Ein Zusatz von Zy zum normalen Serum bewirkt eine Herabsetzung der opsonischen Wirkung, die durch die Zufuhr von P wieder hergestellt werden kann;

h) seine Wirkung auf Tumoren.

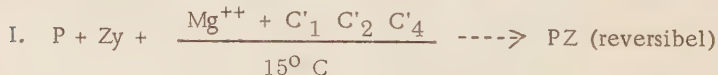
Im Tierexperiment konnte beobachtet werden, daß das Anwachsen von Carcinomzellenimplantaten durch Injektionen von Zy gehemmt wurde (41). Neuerdings hat auch FUMAROLA (16) über dieses Thema berichtet.

3. Die Bedeutung des P in der klinischen Medizin wurde durch die Feststellung einer Titererniedrigung beim hämorrhagischen Schock (12, 13), Pepton-Schock (14) und nach Röntgenbestrahlung (44) gesichert. Die verminderte Resistenz gegenüber bakteriellen Infektionen könnte in diesen Fällen durch den Abfall des P-Titers bedingt sein. Eine bestimmte Korrelation zwischen Massivität eines bakteriellen Infektes und Höhe des P-Titers konnte allerdings nicht regelmäßig bestätigt werden. Es sei noch vermerkt, daß das Auftreten niedriger P-Titer bei krebserkrankten Menschen gelegentlich beobachtet wurde (22, 49), wobei die Titerhöhe jedoch in keiner Beziehung zur Größe und Art des Neoplasmas stand. Auch gewisse Teileffekte der unspezifischen Reiztherapie konnten auf ein Mitwirken des P-Systems bezogen werden (6, 18, 25 c, 50 c).

4. Nach PILLEMERS Grundversuchen (44) mit Humanserum und dem unlöslichen Hefepolysaccharid Zymosan läßt sich die Serologie des P-Systems folgendermaßen beschreiben:

P kann seine Wirkung nur in einem Serummilieu entfalten, in dem alle 4 Komplementkomponenten enthalten sind. Es werden die Komplementkomponenten C'_1 , C'_2 und C'_4 auf bisher noch ungeklärte Weise für die Funktion des P-Systems benötigt, aber nicht inaktiviert. Nur C'_3 erleidet eine Inaktivierung in einem Maße, wie es dem (z.B. bakteriziden) Vorgang entspricht. Außerdem ist das Vorhandensein von Magnesium-Ionen in einer Mindestkonzentration von $5 \cdot 10^{-5}M$ erforderlich, wozu die im normalen Humanserum vorhandene Konzentration genügt. Das Mg^{++} -Ion kann auch durch Co- und Mn-Ionen ersetzt werden (62). In einem Serum, dem eine der C' -Komponenten fehlt, oder das für 30 min auf $50-52^\circ C$ erhitzt wurde (so daß die thermolabilen Komponenten C'_1 und C'_2 unwirksam wurden) oder dem Mg-Ionen entzogen worden sind, ist P ohne Aktivität. Die Diskussionen über die komplexe Funktion des Komplements in diesem Zusammenhang und die Frage nach der Bedeutung seiner einzelnen Faktoren ($C'_1-C'_4$) sind noch im Gange. ISLIKER (28) ist der Ansicht, daß die 1. Komplementkomponente, eine Proesterase (36), durch den PZ-Komplex aktiviert wird. Aus den phospholipoidreichen Komplementkomponenten C'_1 und C'_3 soll sich dann das stark lytische Lyssolezithin bilden.

5. Es wurde bereits erwähnt, daß gewisse Beziehungen zwischen hochmolekularen Polysacchariden bzw. Lipopolysacchariden und P bestehen. In vitro existieren derartige Zusammenhänge ebenfalls. Auf dieser Tatsache beruht die Messung von P in PILLEMERs Grundversuch (44), dessen Prinzip darin besteht, daß man das unlösliche Hefepolysaccharid Zy, das die Eigenschaft hat, sich an C'_3 (43) und an P (44) zu binden, auf das in einem Serum befindliche P in einer ersten Reaktionsphase bei $17^\circ C$ einwirken läßt. Der gebildete Properdin-Zymosan-Komplex wird abzentrifugiert und danach in einem Serum, das frei von P ist, in dem sich aber noch die C'_3 -Komponente befindet, versetzt. C'_3 wird dann in dem Maße, in dem P im PZ-Komplex enthalten ist, inaktiviert - ein Vorgang, der sich durch Titration des noch vorhandenen C'_3 mittels eines hämolytischen Systems objektivieren läßt. Die zweistufige Reaktion ist von PILLEMER in folgendem Schema zusammengefaßt worden:



Vom Arbeitskreis um PILLEMER (5 b, 42) wurde neuerdings berichtet, daß bei

der Reaktion zwischen P, Zy und C'₃ zwei Faktoren A und B notwendig sind, die dem bisherigen C' entsprechen, sich aber von ihm durch unterschiedliche Fermentresistenzen unterscheiden. Für die Bakterizidie werden sie eigenartigerweise nicht benötigt; hier tritt C' an ihre Stelle. Faktor A entspricht dem früheren C'₄ (das für die Reaktionen I und II erforderlich sein soll), Faktor B dem bisherigen C'₁ und C'₂ (das nur für die Reaktionsstufe I benötigt werden soll).

Außer dieser serologischen P-Bestimmung mittels Zymosan (47) bestehen noch folgende andere Methoden:

- b) das serologische Inulinverfahren nach McNALL (39) (s. auch SCHEIF-FARTH und Mitarbeiter (54)),
- c) die mikrochemische P-Bestimmung (27),
- d) die Messung mittels Lyse von mit Tannin behandelten Erythrozyten (23),
- e) die Messung auf Grund einer Neutralisation der Bakteriophagenwirkung (2, 25 b).

In der vorliegenden Arbeit haben wir uns mit der erstgenannten Methode, die in praxi am häufigsten angewandt wird, beschäftigt. Sie ist oft modifiziert worden (9, 15, 17, 29, 32, 35, 37, 66, 68) und stellt immer noch die einfachste Methode der P-Titration dar. Wie oben schon erwähnt, verwendet man als Hilfsmittel Polysaccharide wie Zy oder - seltener - Inulin.

B. 1. Ausgehend von der Tatsache, daß verschiedene Zy-Präparationen existieren, die von verschiedenen Firmen aus verschiedenen Hefen hergestellt werden und makroskopisch ein unterschiedliches Aussehen besitzen, fragten wir uns, ob denn diese Präparationen in vitro gleiche Wirksamkeit entfalten würden. Diese Frage erscheint uns deshalb wichtig, weil ja die Vergleichbarkeit von P-Titrationen, die mittels Zy ausgeführt werden und bei denen die übrigen Reagenzien gleichartig sind, gewährleistet sein muß. Wir haben deshalb die uns zur Zeit verfügbaren Zy-Präparationen vergleichend auf ihre in vitro-Wirksamkeit zur Bestimmung des P untersucht.

Es entsprach einer derartigen Fragestellung, daß hierbei nicht nur die serologischen Eigenschaften, sondern auch die Mikrostruktur der Zymosane einer näheren Betrachtung unterzogen werden mußten.

2. Folgende Bemerkungen über die Eigenschaften des Zy seien vorausgeschickt: Zymosan (der Name stammt von PILLEMER und ECKER (43)) ist ein wasserunlösliches Polysaccharid aus der Hefezellwand, die selbst 15% des gesamten Trockengewichtes der Hefe ausmacht und zu ca. 75% zwei Polysaccharide enthält: ein unlösliches Glukan und ein lösliches Mannan (40). Das

Glukan besteht aus Ketten von 1,3- β -verknüpften Glukosemolekülen (pro Kette durchschnittlich 9); die einzelnen Ketten sind 1,2- β -verbunden (40). Das Mannan enthält gereinigt noch 0,3% Phosphor, was auf seine Beziehungen zum Zellwandprotein hinweist.

Makroskopisch imponiert Zy - je nach Präparation - als weißes bis graues Pulver. Die durchschnittliche Partikelgröße beträgt 3μ (7) (Hefezellen haben einen Durchmesser von ca. 6μ). Di CARLO und FIORE (7) untersuchten 2 verschiedene Zymosantypen (A und B von Fleischmann, s.a. Kapitel "Methodik" A, 2) hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung und fanden keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Präparationen. Ihre Analysen zeigten folgende Zusammensetzung des Zy (in % des Trockengewichtes):

Gesamtpolysaccharide	70	-	75	%
Glukan	50	-	58	%
Mannan	17	-	22	%
Protein-Stickstoff	2,2	-	2,8	%
Protein	13,3	-	17,1	%
Glucosamin-Stickstoff	0,06	-	0,07	%
Glucosamin	0,71	-	0,81	%
Chitin	0,78	-	0,87	%
Fett	5,5	-	6,9	%
Asche	2,94	-	3,42	%
Phosphor	0,71	-	0,79	%
Magnesium	0,28	-	0,51	%

Abweichende Ergebnisse erzielten SCEVOLA (52), der allerdings auch ein anderes Herstellungsverfahren anwandte, und NORTHCOTE (40).

Die immunologischen Eigenschaften des Zy sind anscheinend bis zu einer obliegt notwendigen Minimalkonzentration vom Mg- und P-Gehalt unabhängig (29, 43).

Partielle Degradierung mit Säuren oder Laugen ($\rightarrow$ N = 0,24 %) führt zum Verlust der Reaktivität gegen C₃, nicht jedoch gegen P (27). Die Bindung an P selbst erfolgt in stöchiometrischen Proportionen. BLUM und Mitarbeiter (5 a) geben folgende Optimalbedingungen an:

	für RP-Herstellung		für R ₃ -Herstellung		für Elution von P aus PZ
Temp. Optimum(°C)	15	- 25	5	- 25	15
pH-Optimum	6,2	- 8,2	5,9	- 9,1	6,9 - 7,6
Ionenstärke	0,075	- 0,25	0,075	- 0,25	0,15 - 0,20

Die Ursache der Aktivität des Zy glauben PILLEMER und Mitarbeiter (47) in bestimmten räumlichen Konfigurationen von Zuckerresten zu sehen; die An- oder Abwesenheit von polaren Gruppen spiele hierbei keine wesentliche Rolle. Auch ISLIKER und LINDER (27) messen der räumlichen Anordnung und Verknüpfung der Hexose-Einheiten im Molekül eine entscheidende Bedeutung für die Aktivität des Polysaccharids bei. Nach BLATTBERG (4a) haben die polymeren Zucker anscheinend Akzeptorstellen für affine Rezeptoren am P-Molekül.

Auf die biologischen Eigenschaften des Zy war bereits im Zusammenhang mit dem Properdin-Problem eingegangen worden (Literatur: 16, 45, 47, 63). Hier soll nur noch erwähnt werden, daß Zymosan auch antigene Eigenschaften hat (4b).

Zur Herstellung des Zy bedienen sich ISLIKER und LINDER (29) eines Phenol-Wasserverfahrens, das von WESTPHAL (65) und Mitarbeitern zur Gewinnung von Polysacchariden aus Bakterien angegeben wird, nämlich Kochen der Hefe in gesättigter Phenol-Wasserlösung. Die löslichen Polysaccharide gehen dabei in die wässrige Phase der Lösung über. Der Rückstand wird im Soxhlet mit Wasser, dann mit 95%igem Alkohol extrahiert. Zum Schluß wird mit absolutem Alkohol getrocknet.

Auf das wesentlich kompliziertere tryptische Verdauungsverfahren von PILLEMER und Mitarbeitern (47), sowie auf die Präparationsmethoden von RZUCIDLO (51) und SCEVOLA (52) sei hier nicht näher eingegangen.

Von einem Zy-Präparat in Form eines wasserunlöslichen Pulvers muß nach dem Obigen erwartet werden, daß es bei 17°C in Gegenwart der 4 C'-Komponenten und Mg^{++} -Ionen einen Komplex mit P bildet, ferner, daß es C'_3 selektiv bei 37°C aus Humanserum inaktiviert. Die Elution von P aus PZ, die ebenfalls von der Art des Zy abhängig ist, können wir für unsere Betrachtung, die ja nur die Messung von P im Auge hat, unberücksichtigt lassen. Diese Forderungen müssen nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ so erfüllt werden, daß man bei der P-Bestimmung exakte und reproduzierbare Ergebnisse erhält.

II. METHODIK

A. 1. Das Prinzip der Properdin (P)-Messung wurde zwar bereits in der Einleitung besprochen; zum näheren Verständnis muß aber noch auf einige Einzelheiten der Bestimmung eingegangen werden.

Da vor Beginn einer solchen Messung nicht bekannt ist, welche Mengen C'_3 durch das im Testserum vorhandene P inaktiviert werden, ist ein Überschuß an Komplement im System notwendig. Aus diesem Grund setzt man dem Ansatz ein properdinfreies, aber komplementreiches Serum, das sogenannte RP (= removed properdin)-Serum, zu. Man gewinnt es dadurch, daß man ein Originalserum bei 17°C mit Zy reagieren läßt; und zwar verwendet man hierfür Meerschweinchen- (15) oder Human- (47) Serum. Da 80% aller menschlichen Seren ein unzulängliches RP-Serum liefern (15), haben wir bei unseren Versuchen Meerschweinchen-RP verwendet.

Die eine Hämolyse limitierende Komponente des Komplements ist diejenige, die im System quantitativ am geringsten vorhanden ist. Zur limitierenden Komponente muß also in unserem Falle C'_3 gemacht werden. Das kann dadurch erreicht werden, daß man C'_1 , C'_2 und C'_4 im Überschuß in Form eines C'_3 -freien Serums zum System zusetzt. Dieses sogenannte R_3 (removed C'_3)-Serum wird durch Einwirkung von Zy auf Originalserum bei 37°C gewonnen. Auch hier ist die Verwendung von Meerschweinchenserum von Vorteil, weil in ihm C'_3 als limitierende Komplementkomponente auftritt (20).

Für diese beiden sogenannten R-Seren hat PILLEMER bestimmte Gütekriterien angegeben, auf die im Zusammenhang mit der Herstellung dieser Seren weiter unten eingegangen werden wird.

2. Für unsere Versuche kamen als Reagenzien in Betracht:

a) Zymosan (Zy).

Die zu untersuchenden fabrikneuen Zy-Präparationen waren folgende:

- 1) Charge "17" der Firma Zyma-Blaes, München (graues Pulver),
- 2) Charge "19" der Firma Zyma-Blaes, München (weißes Pulver),
- 3) Charge "30" der Firma Zyma-Blaes, München (alkoholische Suspension), 1 g = 94 mg Trockensubstanz,
- 4) Charge "31" der Firma Zyma-Blaes, München (graues Pulver).

Charge 30 und 31 stammen aus demselben Herstellungsvorgang, 30 wurde in der alkoholischen Suspension belassen, 31 zusätzlich dehydriert,

- 5) Zymosan der Firma Behring-Werke (B), Marburg/Lahn (weißes Pulver),
- 6) Zymosan "Typ A" der Firma Fleischmann (F), Standard Brands Inc., New York (weißes Pulver).

Zy A dient nach Angaben der Firma zur Herstellung von RP, R_3 und zur P-Titration, während Zy B (das von der Firma nicht mehr verkauft wird) zur Herstellung und Reinigung von P sowie evtl. zur RP-Herstellung geeignet ist.

Absichtlich haben wir von einer "Aktivierung" vor Verwendung der Zymosane (9, 27) abgesehen (Begründung s. Kapitel "Diskussion"). Die benötigte Menge der Charge 30 wurde vor Gebrauch 3 x in physiologischer NaCl-Lösung gewaschen.

b) Human-Serum zur Testung.

Wir bestimmten mit Hilfe der o. a. 6 Zy-Chargen die P-Titer von 50 nach den Gesetzen des Zufalls ausgewählten Humanseren (Patientenserum der Medizinischen Universitätspoliklinik, Mainz). Das Blut wurde am Tage vor der Testung abgenommen, danach zentrifugiert und das Serum bei ca. -20°C (Tiefkühltruhe) bis zum nächsten Tag aufbewahrt. Pro Tag bestimmten wir die Titer von 2 Seren.

c) RP-Serum.

Die Herstellung und Prüfung des R_3 -Serums wird weiter unten beschrieben. Wir verwendeten für die P-Titrationen das RP-Serum der Charge 30, das sich - wie weiter unten ausgeführt wird - als für unsere Zwecke am günstigsten erwies.

d) R_3 -Serum.

Die Herstellung und Prüfung des R_3 -Serums wird ebenfalls weiter unten beschrieben. Die Herstellung des für die P-Titrationen verwendeten R_3 erfolgte ebenfalls mit der Zy-Charge 30.

e) Veronalpuffer (VP) (44) zur Verdünnung der Reagenzien.

Er wurde hergestellt aus:

- 85,0 g NaCl,
- 5,75 g Diaethylbarbitursäure,
- 3,75 g Na-diaethylbarbiturat,
- 5,0 ml 1/m MgCl_2 -Lösung,
- 1,5 ml 1/m CaCl_2 -Lösung.

Die Bestandteile wurden in 1500 ml heißem Aqua destillata aufgelöst;

nach dem Abkühlen ergänzt man mit Aqua dest. auf 2 l. Der pH-Wert betrug 7,4. Zum Gebrauch wurde die benötigte Menge VP im Verhältnis 1 : 5 mit destilliertem Wasser verdünnt.

f) Hämolytisches System.

Frisch entnommenes Hammelblut wurde durch Schütteln defibriert; die so gewonnenen Erythrozyten wurden 2 Tage lang in ALSEVERscher Lösung (1) aufbewahrt, die folgendermaßen zusammengesetzt ist:

20,5 g Glucose,
8,0 g Natriumcitrat · 2 H₂O,
4,2 g NaCl,
0,2 g Zitronensäure,
500,0 ml Aqua destillata.

Der pH-Wert betrug 6,1.

Vor Gebrauch wurden die Erythrocyten 2 x je 5 min mit physiologischer Kochsalzlösung und danach 1 x 5 min lang mit VP gewaschen, bis die überstehende Flüssigkeit nach dem Zentrifugieren klar war. Zum Zwecke der Herstellung des hämolytischen Systems wurde einer 2,4%igen Erythrocytenaufschwemmung in VP der gleiche Teil einer Lösung, die 8 Einheiten Kaninchenambozeptor der Behring-Werke Marburg/Lahn (= 0,01 ml/40 ml VP) enthielt, zugefügt und die Mischung 10 min lang bei 37° C inkubiert (sogenannte Sensibilisierung). Der Überstand dieses Systems mußte für sich eine Extinktion von 0 ergeben, die vor Verwendung geprüft wurde. Zur Testung der R-Seren verwendeten wir eine 2,4%ige, zur P-Titration eine 1,2%ige Hammelerythrozyten-Suspension plus jeweils gleiche Teile Ambozeptorlösung.

3. Grundsätzlich bestehen zwei Möglichkeiten der Durchführung einer serologischen Properdintitration:

- a) die Messung des sog. "total properdin" (z.B. 9, 15, 29, 47),
- b) die Messung des sog. "available properdin" (z.B. 3, 17, 34 a, 35, 37, 66).

ad a) PILLEMER und Mitarbeiter (47) setzten bei ihren Versuchen dem in einer Reihe verdünnten Testserum konstante Mengen Zy und RP-Serum zu und inkubierten diese Suspensionen für 60 min bei 37° C unter Schütteln. Nach Abzentrifugieren des PZ-Komplexes testeten sie die verbliebene C₃-Restaktivität der Ansätze unter Zusatz eines R₃-Serums an einem hämolytischen System (Inkubationsdauer 30 min bei 37° C).

ISLIKER (29) modifizierte diese Methode dahingehend, daß die gesamte

(einstündige) Inkubation bei 37°C und ohne Zusatz von R₃ erfolgte, d.h. die beiden Stufen der P-Zy-C'₃-Bindung wurden zusammengezogen. Ein Abzentrifugieren fand nicht statt. Die P-Titer lagen etwas höher als bei PILLEMER.

ad b) Da bei diesem obengenannten Vorgehen die Bindung des P an Zy auch von den nicht körpereigenen R-Seren mitbestimmt wird, machte LEON (35) den Vorschlag, außer diesem "total properdin" das sogenannte "available properdin" zu bestimmen. Darunter versteht man die Menge des P, die man in einem Serum nach der Inkubation mit Zy bei 17°C und nachfolgendem Zusatz von Komplement-Faktoren bei 37°C bestimmen kann. Hierbei wird also die Bildung des PZ-Komplexes nicht durch körperfremde Einflüsse gestört.

Diese Methode hat folgende Vorteile:

1. Die Inhibitionswirkung gewisser in pathologischen Seren gehäuft vorkommender Cofaktoren (58,66) (z. B. auch α_2 -Globulinfraktionen (26)), die den Ablauf der Reaktion zwischen dem PZ-Komplex und C'₃ beeinflussen, wird ausgeschaltet. Hingegen werden Faktoren, die die Bindung zwischen P und Zy beeinflussen, nicht berücksichtigt.
2. Eine mögliche antikomplementäre Aktivität des Testserums (wie sie z. B. in hämolytischen Seren vorkommt) kann eliminiert werden. Diese wäre in der Lage, eine P-Bestimmung unmöglich zu machen, oder sie würde zu hohe Titer liefern, falls sie beim Verdünnen des Serums in ihrer Wirkung allmählich nachließe.
3. Das im Testserum vorhandene C'₃, das nach der Methode von FRITZSCHE, FISCHER, SCHWICK und SCHULTZE (15) die Properdin-Titration sehr kompliziert gestaltet, bedarf bei dieser Methode keiner besonderen Berücksichtigung.

Dem "available properdin" wäre z. B. eine echte biologische Valenz bezumessen, wenn der Fall einträte, daß trotz normalem oder erhöhtem P-Gehalt des Serums einer der 4 Komplementfaktoren unzureichend vorhanden wäre, so daß das ganze Properdin-Komplement-System nicht aktiv werden könnte. Seine Bedeutung wird durch die Versuche von WARDLAW und PILLEMER (62) unterstrichen: Die Autoren fanden, daß die bakterizide Wirkung des P-Systems nur von körpereigenen Faktoren bestimmt wird.

Wir haben in unseren Versuchen das "available properdin" bestimmt. Die von uns benutzte Technik (17) ist eine geringfügige Abänderung der von WILLERS, PONDMAN und WINKLER (66) angegebenen Methode.

- B. Die eigentliche Problemstellung der vorliegenden Arbeit wurde in der Einleitung diskutiert. Von den zu untersuchenden Zy-Präparationen mußten für ihre in vitro-Wirksamkeit gewisse Bedingungen gefordert werden.
1. Sie mußten, im Testserum suspendiert, einen pH-Wert und eine Ionenstärke liefern, die für eine optimale Bildung des PZ-Komplexes erforderlich sind.
 2. Sie durften nicht wesentlich bakteriell verunreinigt sein, da die metabolische Aktivität von Keimen möglicherweise einen Einfluß auf ihre Wirksamkeit haben konnte.
 3. Sie durften keine antikomplementäre Aktivität gegenüber C'_1 , C'_2 und C'_4 entfalten.
 4. Sie mußten bei der Herstellung einer Suspension eine günstige Korngrößenverteilung, d.h. eine genügend große Gesamtoberfläche bieten, so daß innerhalb der vorgeschriebenen Versuchszeit die PZ-Bindung bzw. die C'_3 -Aktivierung durch PZ vollständig erfolgte.

Insgesamt also mußten sie in der Lage sein, zur

- a) RP-Serum- und
- b) R_3 -Serum-Herstellung und
- c) zur P-Titration zu dienen.

Die Frage, ob die einzelnen Zy-Chargen bei der Herstellung der R-Seren und der Bestimmung des "available properdin" in qualitativer und quantitativer Beziehung differieren, sollte in unseren Versuchen beantwortet werden.

C. Im folgenden wird auf die praktische Seite der Zymosantestung ausführlich eingegangen. Es sei vorausgeschickt, daß sämtliche Testungen doppelt angesetzt wurden. Wir prüften zunächst die physikalischen (siehe unter 1.) und dann die serologischen (siehe unter 3.) Eigenschaften der Zymosan-Serum-Suspensionen. Zuvor mußte das zur R-Seren-Herstellung benötigte Serum auf seinen Gehalt an C'_3 getestet werden (siehe unter 1.). Eine chemische Analyse der einzelnen Zymosane haben wir aus technischen Gründen nicht durchgeführt.

1. Das sog. "Originalserum", das zur R-Seren-Herstellung diente und das aus Meerschweinchenblut (s.o.) gewonnen wurde, untersuchten wir vor der Herstellung und Prüfung der R-Seren auf die Höhe seines C'_3 -Titers. Diese Bestimmung gestaltete sich folgendermaßen:

Herstellung einer Verdünnungsreihe des Originalserums (in Uhlenhuthröhrchen) von 1 : 1 bis 1 : 64. Nach Zusatz von 2 Einheiten [†]) R₃ und hämolytischem System Sensibilisierung bei 37°C für 30 min; anschließend wurde zentrifugiert und photometriert ^{††}).

Die Berechnung des C'₃-Titers erfolgte nach der Definition von PILLEMER und Mitarbeitern (47): Eine Einheit von C'₃ löst bei Gegenwart von 2 E R₃ (etwa 0,05 ml) und 1 ml sensibilisierten Blutzellen (hier 1,2%ig) in 1,5 ml Gesamtvolumen 50% der Blutzellen in 30 min bei 37°C. Damit z. B. in 1 ml der benutzten C'₃ 120 E sind, müssen 0,2 ml einer Verdünnung von 1 : 24 diese Bedingungen erfüllen, denn 24/0,2 = 120.

Außer dieser "klassischen Methode" zur Ermittlung des C'₃-Titers haben wir noch ein anderes Verfahren benutzt, das sich lediglich in den Mengen der zugesetzten Reagenzien von den oben beschriebenen unterscheidet: Je 0,1 ml Testserum, R₃-Serum und Zy-Suspension, 0,2 ml hämolytisches System (0,6%ig). Zu Kontrollzwecken haben wir beide Verfahren benutzt. Es ergaben sich dabei keine signifikanten Unterschiede in der Höhe des C'₃-Titers.

2. a) pH-Messung:

Es wurden Suspensionen aller Zy-Chargen im Serum hergestellt. Das Mengenverhältnis Zy : Serum war das gleiche wie bei der Properdintitration beschrieben (s.d.). Die Messung des pH-Wertes dieser Suspensionen erfolgte mit Spezialindikatorpapier, Fa. Merck A. G., Darmstadt. Die Ionenstärke im Serum ist ohnehin optimal für eine PZ-Bildung, so daß ihre Messung hier unterblieb. Das gleiche gilt für die Mg⁺⁺-Ionenkonzentration.

b) Bakteriengehalt:

Zunächst reicherten wir alle Zymosane in Traubenzuckerbouillon an. Die Präparate, welche in Anreicherung Wachstum zeigten, wurden auf

[†]) Eine Einheit R₃ ist die geringste Menge des Originalserums, von dem das R₃ hergestellt war, welche in 30 min bei 37°C 1 ml sensibilisierter Blutzellen völlig löst; geschieht dies z. B. durch 0,1 ml des 1 : 4 verdünnten Originalserums, dann ist 1 E R₃ = 0,1/4 und 2 E = 0,05 ml.

^{††}) Die photometrischen Bestimmungen erfolgten mittels Photometer "Eppendorf" bei einer Wellenlänge von 546 mμ. Verdünnung der Lösung mit Aqua destillata in der Cuvette im Verhältnis 1 : 3.

Blut- und McConkey-Agar in Verdünnungen (1 : 100, 1 : 1000) mit physiologischer Kochsalzlösung (wobei auch hier die Mengenproportionen der P-Bestimmung eingehalten wurden) ausgestrichen und nach 24-stündigem Aufenthalt im Brutschrank (37°C) auf die Zahl der gewachsenen Kolonien untersucht.

c) Antikomplementäre Aktivität:

Es konnte das gleiche Versuchsprinzip wie bei 3 a, α) und 3 b, α) angegeben (s.d.) angewandt werden.

Bestand eine antikomplementäre Aktivität der Zymosane gegenüber den obengenannten Komplementkomponenten, so mußten in den mit Zy versetzten Proben und denjenigen ohne Zy-Zusatz nach Einwirkung des hämolytischen Systems (30 min bei 37°C) unterschiedliche Farbintensitäten in gleichen Verdünnungsstufen vorhanden sein.

d) Korngrößen und Korngrößenverteilung:

Zu ihrer Bestimmung verfügten wir über 2 Möglichkeiten:

α) eine photographische Methode,

β) eine photometrische Sedimentationsanalyse (57, 59) mit Hilfe des Photometers "Eppendorf".

Wir haben die erste Methode bevorzugt, weil sich der Durchführung der zweiten erhebliche Schwierigkeiten entgegenstellten, wie unten gezeigt werden wird.

Wir bereiteten Suspensionen der 6 Zy-Präparationen in Serum; davon wurden mikroskopische Präparate (Objektträger) hergestellt und diese photographiert.

Technische Daten: Plan Achromat 10 bzw. 40 (Zeiss), Objektiv 8x. Durch Vergrößern wurden die Abbildungen auf den Maßstab 200 : 1 bzw. 500 : 1 gebracht, wodurch die Einzelteilchen einer Messung mit dem Stechzirkel zugänglich wurden. Es wurde eine Durchlicht-Hellfeld-Beleuchtung nach dem KÖHLERschen Prinzip angewandt; mit Hilfe des Elektronenblitzes eliminierten wir die Sichtbarmachung einer BROWNSchen Molekularbewegung der Zy-Teilchen.

Die zweite Methode, welche allerdings nur die Korngrößenverteilung zu objektivieren vermag, beruht auf der Abhängigkeit der Fallgeschwindigkeit fester Teilchen in einem flüssigen Medium von der (bereits bekannten) Teilchengröße, wie sie für kugelförmige Teilchen durch das STOKESsche Gesetz gegeben ist.

$$u = \frac{g \cdot d^2 \cdot (D - D') \cdot \eta}{18}, \text{ wobei}$$

$$u = \frac{h}{t} \text{ ist.}$$

u	=	Fallgeschwindigkeit	(cm/sec)
h	=	Fallhöhe	(cm)
t	=	Fallzeit	(sec)
g	=	Erdbeschleunigung	= 981 (cm/sec ²)
D	=	Dichte des Feststoffes	(mg/cm ³)
D'	=	Dichte der Flüssigkeit	(mg/cm ³)
η	=	Viskosität der Flüssigkeit	(Poise)
d	=	Durchmesser der Teilchen	(cm)

Aus folgenden Gründen war sie für unsere Zwecke unbrauchbar:

- αα) Die einzelnen Zy-Partikel waren keine Kugeln, sondern -wie sich später bei Anwendung der 1. Methode ergab - multiforme Konglomerate oder bestenfalls ellipsoide bis stäbchenförmige Körper, auf die das STOKESsche Gesetz keine Anwendung finden konnte.
- ββ) Die Zy-Teilchen sind teilweise kleiner als 2 μ, während das Verfahren nur verlässliche Werte bis zu Korngrößen von 2 μ liefert, da bei kleineren Teilchen Abweichungen der Extinktion durch Beugungserscheinungen auftreten.
- γγ) Die Dichte des Zy ist kleiner (ca. 0,5 mg/cm³) als die des menschlichen Serums (= 1,026 mg/cm³). Trotzdem sinkt es im Serum ab, weil die Partikel sofort quellen und das Zy somit schwerer wird, wie wir mittels mikroskopischer Betrachtung anfangs trockener, später in H₂O verbrachter Zy-Partikel nachweisen konnten. Zur Bestimmung der Dichte des Zy müßte dieses stark komprimiert werden. Das hieße aber, daß die Versuchsbedingungen, wie sie bei der P-Titration und der R-Seren-Herstellung vorliegen, nicht mehr erfüllt sind.

Bezüglich der Meßtechnik verweisen wir auf die dem Gerät beigegebene Anweisung.

3. a) RP-Serum:

Mischblut von 20 Meerschweinchen wurde zentrifugiert und das Serum abpipettiert. Dieses wurde mit Zy (2 mg/ml) in einem Wasserbad bei 17° C 70 min lang unter ständigem Rühren (Rührstab in der Flüssigkeit) inkubiert, anschließend 10 min. bei 17° C zentrifugiert und der Bodensatz entfernt (er diente später zur R₃-Herstellung, s.d.). Es erfolgte

eine erneute Inkubation unter gleichen Bedingungen mit anschließendem Zentrifugieren (30 min 17°C). Ein derart hergestelltes RP-Serum mußte folgenden Anforderungen entsprechen (47):

- α) Es durfte kein Properdin mehr enthalten,
- β) es durfte nicht antikomplementär sein,
- γ) es mußte nach Zy-Behandlung noch einen C'_3 -Titer von über 80 E/ml besitzen.

ad α) Wir stellten von jedem RP-Serum 4 Verdünnungsreihen (jede von 1 : 1 bis 1 : 32) her; 2 davon wurden mit konstanten Mengen Zy (1 mg/0,1 ml) versetzt. Um C'_3 zur limitierenden Komponente zu machen, wurde allen Röhrchen 0,1 ml R_3 -Serum (Herstellung s.u.) zugesetzt. Darauf ließen wir das Zy 60 min bei 37°C einwirken; alle 10 min wurden die Proben geschüttelt. Wenn im RP-Serum kein P mehr vorhanden war, mußte nach Zusatz des hämolytischen Systems (das wir 30 min bei 37°C einwirken ließen und dessen nicht lysierte Erythrozyten danach abzentrifugiert wurden), gleiche Farbintensitäten in gleichen Verdünnungsstufen vorhanden sein.

ad β) Es wurde ein Vergleich der hämolytischen Aktivitäten von 5 Human-Seren (1 : 4 mit VP verdünnt) und der Kombinationen dieser mit dem jeweiligen RP-Serum (je 0,1 ml der betreffenden RP-Seren) durchgeführt. Eine antikomplementäre Aktivität des RP-Serums war dann anzunehmen, wenn eine geringere Extinktion in den mit der Kombination beschickten Reihen auftrat.

ad γ) Eine Verdünnungsreihe des RP-Serums wurde unter Zusatz von R_3 -Serum hergestellt. Zur C'_3 -Bestimmung verwendeten wir die bei der Originalserumprüfung (s. Abs. C, 1.) angeführten Methoden.

b) R_3 -Serum:

Mischblut von 20 Meerschweinchen wurde zentrifugiert und das Serum abpipettiert. Es wurde mit dem bei der RP-Herstellung im ersten Arbeitsgang nach dem Zentrifugieren entstandenen Bodensatz, der aus dem PZ-Komplex bestand, bei 37°C im Wasserbad unter Rühren (Stab) 70 min lang inkubiert. Eine zweite Inkubation (30 min 37°C) folgte nach Zentrifugieren. In Anlehnung an McNALL (39) wählten wir diese Arbeitsweise. Sie beruht auf der Tatsache, daß die Inaktivierung von C'_3 in dem properdinarmen, jedoch komplementreichen Meerschweinchen Serum nur dann vollständig vor sich geht, wenn an Stelle des Zy der Zusatz von PZ-Komplex erfolgte. Der RP-Herstellung entsprechend wurde

die erwähnte Inkubation mit jeder Zy-Präparation zweimal hintereinander durchgeführt. Von dem nach Zentrifugieren gewonnenen R_3 -Serum werden folgende Gütekriterien verlangt (47):

- α) Es darf kein P mehr enthalten,
- β) es darf keine Hämolyse verursachen,
- γ) es darf nicht antikomplementär sein,
- δ) es muß die hämolytische Aktivität derselben Menge von 1 : 15 verdünntem Serum um den Faktor 2 steigern.

ad α) Es wurde dasselbe Prinzip wie bei der Testung des RP-Serums angewandt: Herstellung von 4 Verdünnungsreihen des R_3 -Serums; 2 Reihen wurde Zy zugesetzt. Jedes Röhrchen erhielt außerdem 0,1 ml Misch-RP-Serum (mit Zy 30 hergestellt), das mit VP 1 : 15 verdünnt war.

ad β) Es wurde die Grenzverdünnung des R_3 -Serums, bei der gerade keine Hämolyse mehr auftrat, ermittelt. Diese Verdünnung wurde für die Prüfung, die unter γ) und δ) beschrieben ist, verwandt.

ad γ) und δ) Wie bei der Prüfung des RP-Serums auf antikomplementäre Aktivität verwandten wir auch hier 5 Humansen in der Verdünnung 1 : 15. Es wurden 5 Röhrchen mit je 0,1 ml eines Aktivserums (1 : 15) beschickt, 5 weitere (eines für jedes R_3 -Serum) mit dem Aktivserum 1 : 15 und zusätzlich mit je 0,1 ml R_3 -Serum, dessen Verdünnungsgrad sich nach dem bei β) ermittelten Hämolysegrenzwert richtete. Die Extinktion der mit R_3 plus aktivem Serum beschickten Seren mußte doppelt so hoch sein wie die der Röhrchen mit Aktivserum allein, wenn das R_3 -Serum den geforderten Kriterien entsprechen sollte.

Nach Prüfung der R-Seren haben wir die zu einer P-Titration erforderlichen R-Seren-Mengen errechnet, in Einzelgläser abgefüllt und bei -20°C aufbewahrt. Ein C'-Titerabfall tritt bei dieser Konservierungsart innerhalb von 3 Monaten nicht ein (15).

g) P-Titration;

Je 0,4 ml des unverdünnten Testserums wurden mit 0,4 mg jeder Zy-Präparation (als Pulver bzw. gewaschene Suspension (Charge 30)) in Uhlenhuth-Röhrchen im Wasserbad bei 17°C unter konstantem Schütteln (Becherglas; gleichzeitig 70 min lang inkubiert. Danach wurden die Suspensionen 10 min lang bei ca. 2000 U/min kühlzentrifugiert (17°C). Den abzentrifugierten PZ-Komplex wuschen wir zweimal mit

VP. Danach wurde das Volumen des abzentrifugierten PZ-Komplexes mit VP auf das Originalvolumen von 0,4 ml aufgefüllt. Von den so entstandenen Suspensionen stellten wir in jeweils doppeltem Ansatz Verdünnungsreihen her (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32). Für die Testung eines Serums benötigten wir 72 Röhrchen (= 2 x 6 Reihen entsprechend 6 Zy-Präparationen à 6 Röhrchen). Jedem Röhrchen wurden je 0,1 ml RP-(Misch-) Serum (hergestellt mit Zy 30) (1:4, 6) und 0,1 ml R₃-(Misch-) Serum (gleiche Herstellungsweise) zugesetzt (Begründung für die Verwendung des sog. "Mischserums" siehe unter "Ergebnisse"). Es erfolgte eine Inkubation für 60 min bei 37°C unter Schütteln alle 10 min. Nach der Inkubation wurden jedem Röhrchen 2,0 ml hämolytisches System, welches 30 min bei 37°C einwirkte, zugesetzt. Zum Schluß wurden die Ansätze zentrifugiert und die Überstände photometriert (Photometer "Eppendorf").

Den reziproken Wert derjenigen Serumverdünnung im Testansatz, deren Extinktion bei der photometrischen Messung mit der eines 50%-Hämolysedstandards (31) übereinstimmt, bezeichnet man als eine Properdineinheit/ml (29). Ein solcher Standardansatz wurde aus 1,0 ml hämolytischem System, 1,3 ml VP und einer Spur Saponin hergestellt und dessen Extinktion bestimmt (Wert um 0,50 bei 2,4%iger Erythrozytenlösung, um 0,33 bei 1,2%iger Lösung). Die Extinktionsmessungen der Einzelansätze erfolgten mit dem Photometer "Eppendorf" (Filter 546 m μ) bei einer Verdünnung des hämolytischen Überstandes mit Aqua dest. von 1:3 in der Cuvette. Nur die beiden Ansätze, deren Farbintensitäten die des 50%-Hämolysedstandards flankierten, wurden photometriert.

Die Ermittlung der P-Einheiten erfolgte nach der graphischen Methode von KABAT und MAYER (31): Auf doppelt logarithmischem Papier werden die reziproken Werte der Serumverdünnung auf der Abszisse, die Extinktionen auf der Ordinate aufgezeichnet. Zur Bestimmung der P-Einheiten verbindet man die beiden Extinktionswerte derjenigen Serumverdünnungen, deren Farbintensitäten gerade über und unter derjenigen des 50%-Hämolysedstandards liegen. Die Projektion des Schnittpunktes dieser Verbindungsline mit der parallel zur Abszisse laufenden Standard-Extinktionsgeraden auf die Abszisse ergibt die Anzahl der P-Einheiten des betreffenden Serums pro ml.

III. ERGEBNISSE

Wir haben die Versuchsergebnisse tabellarisch zusammengefaßt (s. Tab. 1, 2, 3, 4, 5). Ihre Auswertung geschah in der Weise, daß jeweils der Mittelwert zweier gleicher Messungen verwendet wurde. Im folgenden seien sie kurz erläutert:

ad 1. (s. Tab.1): Prüfung des Originalserums.

- a) Der C'₂-Gehalt des Originalserums genügte den gestellten Anforderungen (> 120 E/ml).
- b) Das Originalserum wies keine antikomplementäre Aktivität auf.

ad 2. (s. Tab.2 und 3): Prüfung der physikalischen Eigenschaften der Zy-Suspensionen.

- a) Der pH-Wert bewegte sich in dem Intervall, das für eine optimale Bildung des PZ-Komplexes erforderlich ist. Die C'₃-Inaktivierung vollzieht sich später ohnehin in einem abgepufferten Milieu.
- b) Die Chargen 17, 30, 31 und B zeigten in Anreicherung kein Bakterienwachstum. In den Chargen 19 und F wuchsen anaerobe Sporenbildner in etwa gleicher Anzahl (ca. 1/10 000 des Keimgehaltes einer 18-stündigen Traubenzuckerbouillon-Kultur).
- c) Die Zy-Präparationen erwiesen sich einschließlich Charge 30 (alkoholische Suspension) als nicht antikomplementär gegenüber RP.
- d) Von den Chargen 17, 19, 30 und 31 konnten keine Korngrößen und -Verteilungen bestimmt werden, da die Partikel zum großen Teil nicht einzeln abgrenzbar waren, sondern als Konglomeratbildungen mit verschiedenen großen Durchmessern vorlagen (s. Abb.1-8). Die wenigen Solitärpartikel zeigten unregelmäßige Strukturen, die zu vergleichenden Messungen nicht herangezogen werden konnten. Eine annähernde Kugelform war bei keinem der Teilchen zu erkennen. Wir beobachteten bei Charge 31 sogar in einzelnen Konglomeraten Lufteinlagerungen, was zur Folge hatte, daß diese Partikel auf dem Serum schwammen. Lediglich bei den Chargen B und F waren Messungen möglich. Wir führten von 125 Teilchen jeder dieser Präparationen an Hand der mikrophotographischen Aufnahmen mit dem Stechzirkel Messungen durch. Die Längsdurchmesser bei Charge B lagen zu ca. 75% im Bereiche von $d = 2-3 \mu$; das Zy wies jedoch etwas zahlreichere Haufenbildungen als Charge F auf. Diese bestand zu ca. 75% aus Partikeln mit $d = 3-4 \mu$.

ad 3 a) (s. Tab. 4 a): Prüfung des RP-Serums.

- α) Ein Properdingehalt war nach zweimaliger Inkubation in keinem der mit verschiedenen Chargen hergestellten RP-Seren mehr festzustellen. Aber auch das Misch-Serum, das nur einmal inkubiert worden war (s. unter 3 γ), enthielt kein P mehr.
- β) Eine antikomplementäre Aktivität war bei keinem der RP-Seren zu beobachten.
- γ) Der C₃-Titer war bei allen RP-Seren zu gering, d.h. < 80 E/ml.

Da also kein RP-Serum hinsichtlich des C₃-Titers genügte, stellten wir mit dem anscheinend am besten geeigneten Zy ein neues RP-Serum her. Wir wählten die Charge 30, mittels derer sich das RP mit dem höchsten C₃-Titer hatte herstellen lassen. Diesmal erfolgte allerdings nur eine einmalige Inkubation 90 min lang bei 17°C, da wir befürchteten, daß eine zweite Inkubation zuviel C₃ wegnehmen könnte. Das neue RP-Serum wurde im Verhältnis 1 : 1 mit den 6 zuerst hergestellten gemischt. Dieses "Mischserum" erfüllte alle Bedingungen eines leistungsfähigen RP-Serums. Besonders bemerkenswert war, daß sein C₃-Titer 160 E/ml betrug.

b) (s. Tab. 4 b): Prüfung des R₃-Serums.

- α) Die R₃-Seren enthielten ebenfalls kein P mehr.
- β) Stark unterschiedliche Hämolysegrenzwerte zwischen den einzelnen Präparationen waren zu beobachten.
- γ) Es ergab sich in keinem Serum eine antikomplementäre Aktivität.
- δ) Nicht alle hergestellten R₃-Seren vermochten die verdünnten Aktivseren zu "reaktivieren". Hörte also z.B. erst bei einer Verdünnung des R₃ von 1 : 32 die Hämolyse vollständig auf, so ergab sich meist kein ausreichender Gehalt an den anderen C'-Faktoren, um eine Reaktivierung zu gewährleisten.

c) (s. Tab. 5): Einzelwerte der P-Titrationen.

Jedes der 50 Seren ergab, mit verschiedenen Zy-Präparationen auf P-Einheiten/ml getestet, Werte, die mehr oder weniger untereinander variierten. Die Testungen mittels der Chargen 30 und 31 wurden nach 10 Versuchen eingestellt. Es war nämlich mit Charge 30, die schon makroskopisch durch eine grobflockige Beschaffenheit imponierte, nicht möglich, eine kontinuierliche Verdünnungsreihe herzustellen, da beim Überpipettieren die groben Partikel die Pipettenöffnung blockierten und somit das Ausfließen bzw. das Einfüllen des Untersuchungsmaterials sehr erschwerten. Außerdem sanken die schweren Teilchen der in der

Pipette befindlichen Suspension sofort nach unten, so daß eine Inhomogenität der einzelnen Verdünnungsstufen resultierte, die sich auch in stark unterschiedlichen Extinktionswerten einer Reihe ausdrückte. Die in Tabelle 5 angeführten P-Einheiten dieser Charge sind deshalb nur grobe Annäherungswerte, die zu einem statistischen Vergleich nicht berechtigen.

Die grobdisperse Charge 31 bildete auch nach mehrmaligem Zentrifugieren kein festes Sediment; ein großer Teil der Partikel schwamm auf der Serum-Oberfläche oder schwebte darin. Eine vollständige Trennung von PZ-Komplex und Testserum war deshalb nicht möglich und damit ein erheblicher Teil der Messung nicht mehr zugänglich.

Die mit den restlichen Zy-Präparationen gewonnenen Ergebnisse werten wir pro Charge statistisch nach dem t-Verfahren aus.

Hiernach ist die Streuung

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum x^2 - m \sum x}{n - 1}}$$

und der mittlere Fehler des Mittelwertes

$$\sigma_M = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

wobei

x = Einzelwert,

m = Mittelwert aus allen Einzelwerten,

n = Anzahl der Messungen

bedeuten.

Es wurden berechnet: $m \pm 2\sigma$

sowie $m \pm 3\sigma_M$

d.h. der Normalbereich und die Fehlergrenzen des Mittelwertes für 95,4% Wahrscheinlichkeit. Ferner errechneten wir zum Zwecke des Vergleichs der Mittelwerte zweier Titrationsendergebnisse den Signifikanzgrad der Differenz zwischen zwei Mittelwerten m_1 und m_2 :

$$t_D = \frac{m_1 - m_2}{\sqrt{\frac{(\sum x_1^2 - m_1 \sum x_1) + (\sum x_2^2 - m_2 \sum x_2)}{n_1 + n_2 - 2} \cdot \frac{(n_1 + n_2)}{n_1 \cdot n_2}}}$$

Eine Differenz wurde dann als statistisch signifikant angesehen, wenn bei einem bestimmten Freiheitsgrad n (= $n_1 + n_2 - 2$) t_D den für die Wahrscheinlichkeit $p = 0,05$ in der Tabelle von STUDENT aufgestellten Wert überschritt.

Im einzelnen ist zu sagen (s. Tab.6): Die mit Zymosan 17 erzielten Resultate wurden nicht statistisch ausgewertet, da der Wert " <1 " zu häufig (in 22 Seren) vorkam. Aus den oben angegebenen Gründen wurden Zy 30 und 31 nicht in die Statistik einbezogen.

Die Höhe der Werte nimmt zu in der Reihenfolge $17 < 19 < B < F$, wobei die Mittelwerte von 19, B und F sich wie $1:1, 6:2,5$ verhalten und untereinander sämtlich statistisch signifikant different sind.

Hinsichtlich der Brauchbarkeit der Zy-Chargen können wir also generell folgende Feststellungen machen: Alle Zymosane liefern, in Serum suspendiert, einen pH-Wert, der für die Bildung von PZ optimal ist. Der Bakteriengehalt war in allen Suspensionen gering oder $= 0$. Antikomplementäre Aktivitäten konnten bei keiner der Chargen festgestellt werden. Zymosan F und B lieferten Suspensionen, die aus homogenen Einzelteilchen (Längsdurchmesser $1-5\mu$) bestanden; die übrigen Chargen erwiesen sich, in Serum suspendiert, als mehr oder weniger inhomogen. Ihre Brauchbarkeit zur P-Titration war stark eingeschränkt; tauglich hierfür erwiesen sich nur die Präparationen 19, F und B, wenn auch die mit ihnen gewonnenen Ergebnisse untereinander different waren. Das P des Originalserums wurde durch alle Zy-Chargen nach ein- oder zweimaliger Inkubation beseitigt. Die RP-Seren waren allerdings nach zweimaliger Inkubation untauglich hinsichtlich ihres C'_3 -Gehaltes; dagegen schien eine einmalige Inkubation mit Zy 30 den C'_3 -Titer nicht ungünstig zu beeinflussen; möglicherweise wäre dies auch bei anderen Zy-Präparationen der Fall gewesen. Hingegen war die vollständige Beseitigung von C'_3 mittels PZ nur schwer möglich, wie sich insbesondere bei den Chargen 17 und 31 zeigte. Für die R_3 -Herstellung erwiesen sich lediglich die Zy 30, B und F als geeignet.

Tabelle 1: Prüfung des Originalserums

Originalserum	antikomplementäre Aktivität			C'3 E/ml
	Ø			160

Tabelle 2: Prüfung der Zymosan-Suspensionen im Serum auf pH-Wert, Bakteriengehalt und antikomplementäre Aktivität

pH-Wert im Serum Bakteriengehalt/ml ^{†)} antikomplementäre Aktivität in Abwesenheit von Properdin	Zymosancharge					
	17	19	30	31	B	F
	7,3	7,3	7,6	7,1	7,5	7,5
	Ø	3 x 10 ⁻⁴	Ø	Ø	Ø	3,5 x 10 ⁻⁴
	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

^{†)} aerobe SporenbildnerTabelle 3: Korngrößen und Korngrößenverteilung der Zymosan-Suspensionen im Serum (Chargen B und F ^{†)})

Charge B Charge F	gemessene Teilchenzahl	Korngrößen in (größter Durchmesser)				
		1,0	2,0	3,0	4,0	5,0 6,0
	125	20 (16) ^{††)}	56 (45)	37 (29,5)	10 (8)	2 (1,5)
	125	5 (4)	20 (16)	36 (29)	54 (43)	10 (8)

^{†)} Bezüglich der Chargen 17, 19, 30 und 31 siehe Text (Seite 19).^{††)} Die Zahlen in Klammern geben die %-Werte wieder.

Tabelle 4a: Prüfung der RP-Seren

	Zymosancharge						Misch-RP ^{†)}
	17	19	30	31	B	F	
Properdingehalt	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Antikomplementäre Aktivität	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
C ₃ E/ml	30	20	50	60	30	20	160
Verlust in % C ₃ gegenüber Originalserum	81,4	87,5	69,0	62,5	81,4	87,5	0,0

^{†)} Herstellung siehe Text (Seite 20).

Tabelle 4b: Prüfung der R₃-Seren

	Zymosancharge						Misch-R ₃ ^{†)}
	17	19	30	31	B	F	
Properdingehalt	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Hämolyse = 0 bei Verdünnungsgrad 1:	32	4	16	32	8	4	16
Antikomplementäre Aktivität	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Reaktivierung eines Aktivserums 1:15	Ø	• (+) ⁺⁺⁾	+	Ø	+	+	+

^{†)} Herstellung siehe Text (Seite 20).

⁺⁺⁾ Grenzwert.

Tabelle 5: Einzelwerte der P-Titrationen (in E/ml Testserum)

Testserum Nr.	Zy mos an ch ar gen					
	17	19	30	31	B	F
1	< 1	< 1	1,5	< 1	1,6	1,3
2	< 1	1,0	1,0	< 1	1,7	20,0
3	2,5	2,6	3,0	< 1	18,0	28,0
4	1,0	2,1	4,2	< 1	5,5	6,5
5	1,5	6,5	7,3	< 1	14,0	30,5
6	2,8	5,2	3,4	< 1	23,0	32,0
7	1,0	7,7	2,0	< 1	16,0	25,0
8	3,6	5,5	3,3	1,9	8,0	16,0
9	2,0	2,2	2,7	< 1	3,8	3,9
10	1,7	2,0	1,4	< 1	2,0	8,0
11	6,5	11,0			22,0	23,0
12	1,9	3,4			11,0	21,0
13	6,5	8,5			20,0	22,0
14	1,9	6,5			17,0	17,0
15	< 1	1,3			4,4	7,5
16	5,7	14,0			27,0	32,0
17	2,0	1,1			3,4	2,2
18	< 1	< 1			1,5	1,9
19	< 1	1,0			1,4	2,9
20	9,5	12,0			22,0	32,0
21	1,9	3,0			3,4	4,0
22	1,0	1,4			2,4	2,6
23	8,5	14,0			12,0	18,0
24	2,2	3,3			5,0	5,5
25	14,0	18,0			32,0	32,0
26	< 1	1,7			1,6	3,7
27	< 1	< 1			< 1	1,2
28	2,8	6,5			6,0	12,0
29	1,2	2,2			1,6	3,6
30	< 1	< 1			< 1	1,0
31	< 1	< 1			< 1	1,2
32	7,0	24,0			28,0	32,0
33	1,8	3,0			3,2	6,3
34	< 1	1,0			1,5	3,4

Fortsetzung der Tabelle 5:

Testserum Nr.	Zymosanchargen					
	17	19	30	31	B	F
35	< 1	2,8			2,4	4,5
36	< 1	2,0			1,7	8,5
37	1,6	4,0			3,4	8,5
38	1,9	3,6			3,8	11,2
39	< 1	1,9			1,6	4,8
40	< 1	3,8			3,0	4,8
41	< 1	2,7			2,2	4,0
42	< 1	1,2			1,2	2,0
43	< 1	< 1			< 1	2,0
44	1,8	5,0			6,0	14,0
45	< 1	2,6			1,9	4,0
46	< 1	1,5			1,6	3,8
47	< 1	2,4			1,7	4,6
48	2,0	12,0			6,5	8,0
49	< 1	< 1			< 1	2,2
50	< 1	2,4			2,6	8,0

Tabelle 6: Statistische Daten für die P-Titrationen (in E/ml Testserum)

	Zymosanchargen					
	17 ⁺	19	30 ⁺	31 ⁺	B	F
m (E/ml)	-	4,5	-	-	7,3	11,1
σ	-	4,92	-	-	8,46	10,25
σ_M	-	0,696	-	-	1,2	1,45
$m \pm 2\sigma$	-	1 - 14,4	-	-	1 - 24,2	1 - 31,6
$m \pm 3\sigma_M$	-	2,4 - 6,6	-	-	3,7 - 10,9	6,8 - 15,5
signifikant different gegen	-	B und F	-	-	19 und F	B und 19

*) Ergebnisse wurden nicht statistisch ausgewertet (Begründung siehe Seite 12).

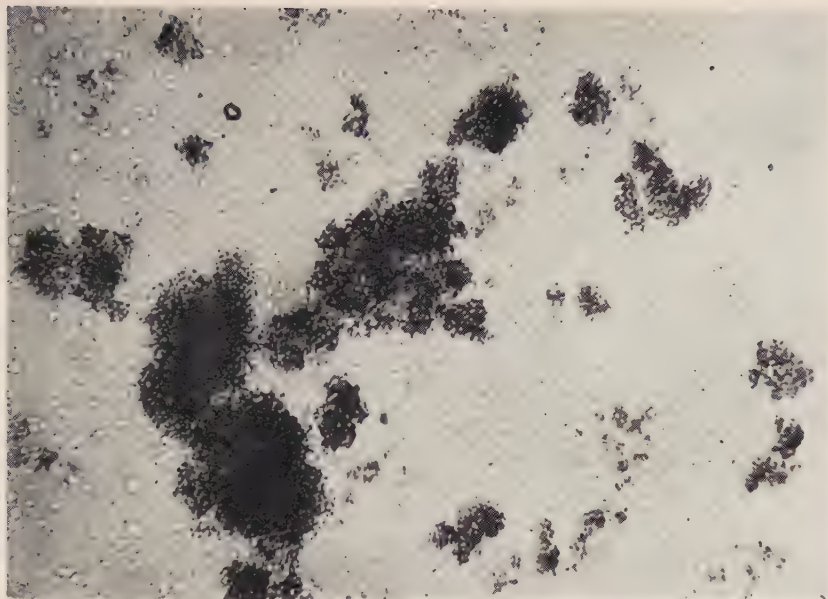


Abbildung 1: Charge 17 (1 : 200)

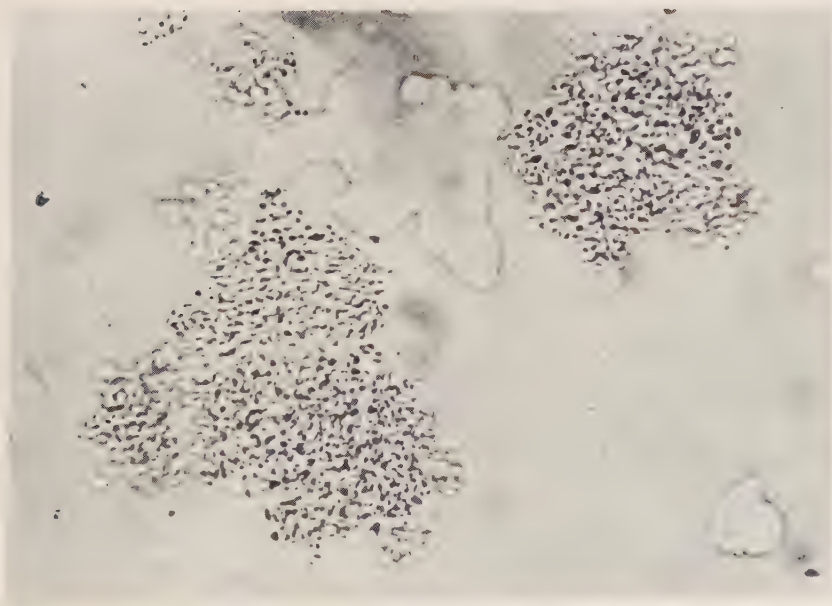


Abbildung 2: Charge 17 (1 : 500)

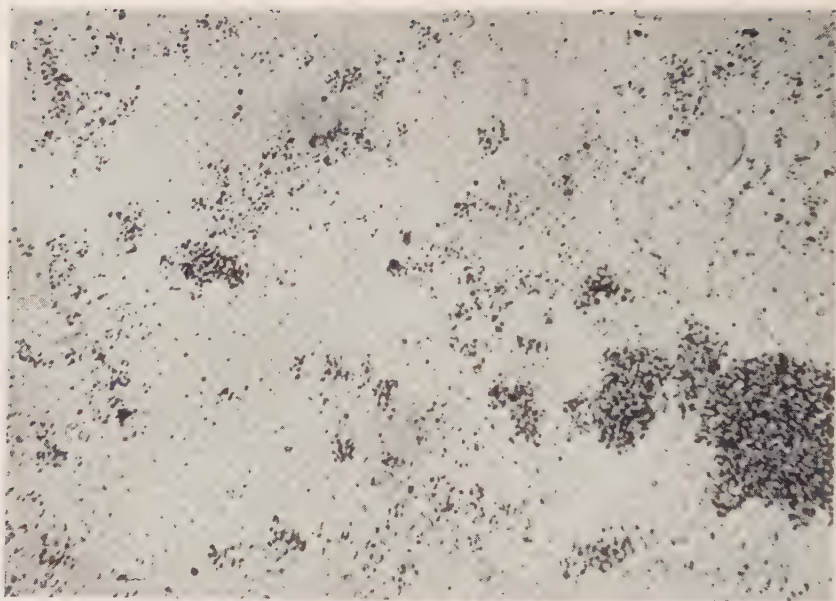


Abbildung 3: Charge 19 (1 : 200)



Abbildung 4: Charge 19 (1 : 500)



Abbildung 5: Charge 30 (1 : 200)

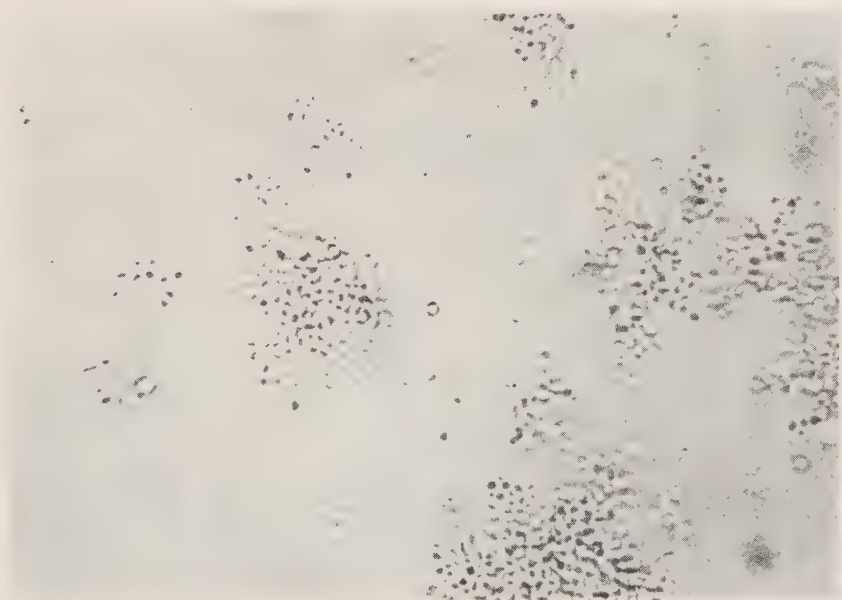


Abbildung 6: Charge 30 (1 : 500)

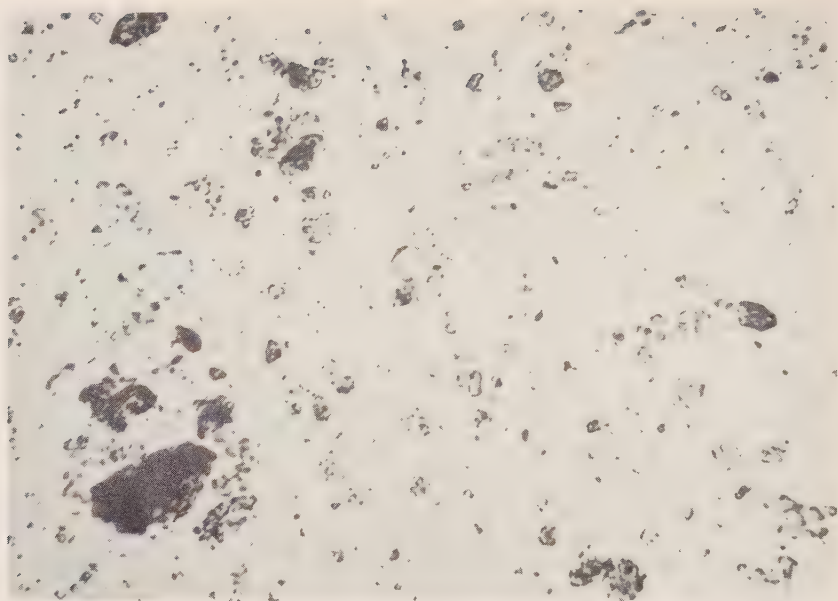


Abbildung 7: Charge 31 (1 : 200)

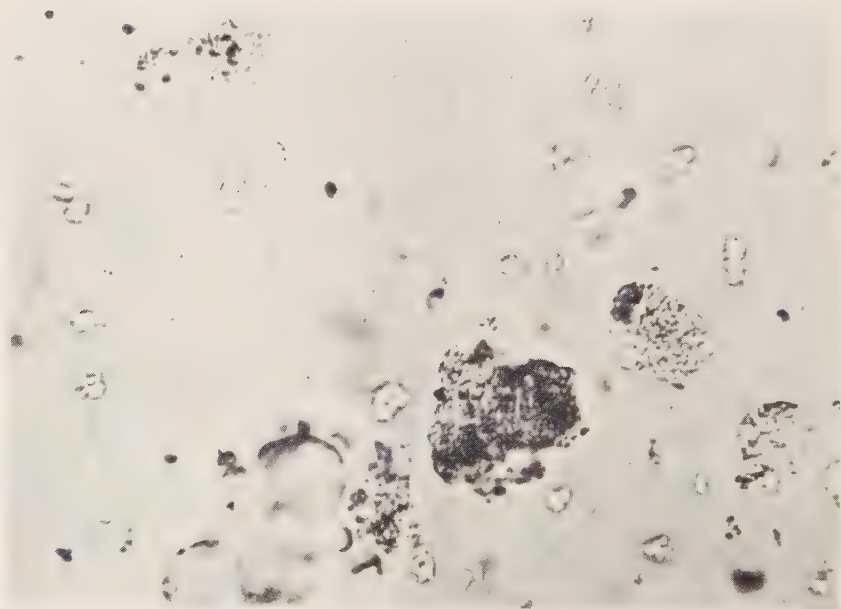


Abbildung 8: Charge 31 (1 : 500)

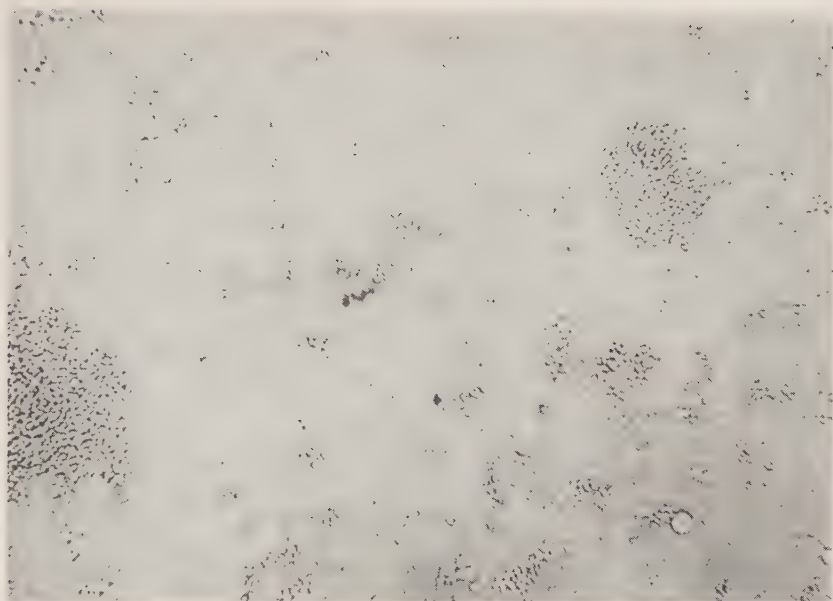


Abbildung 9: Charge B (1 : 200)

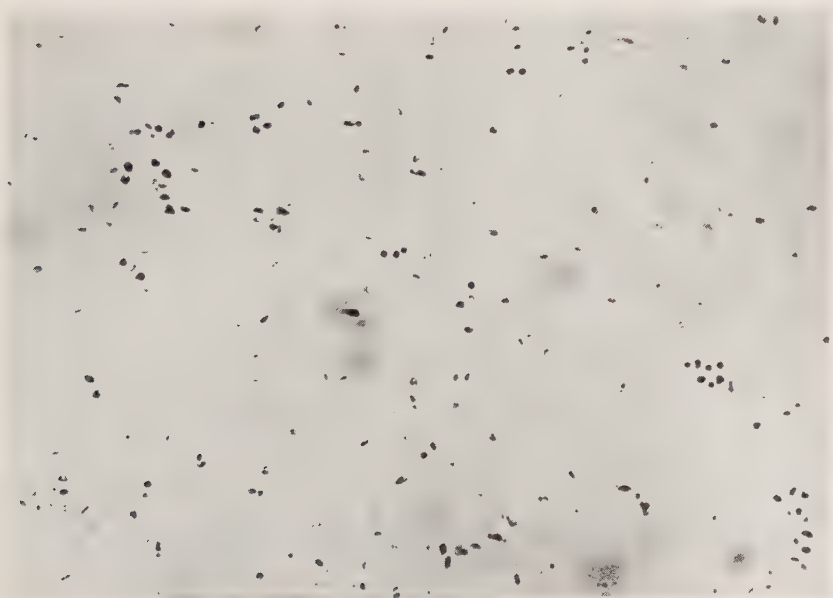


Abbildung 10: Charge B (1 : 500)

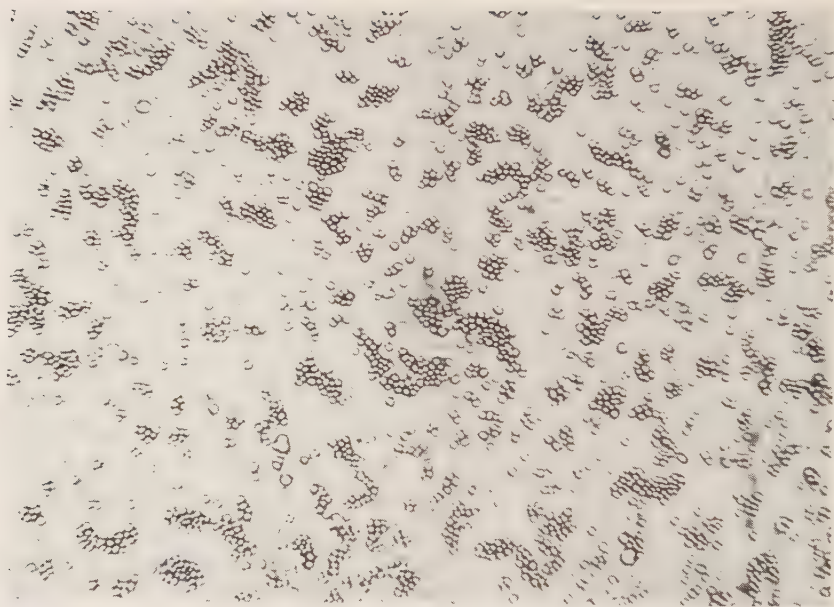


Abbildung 11: Charge F (1 : 200)

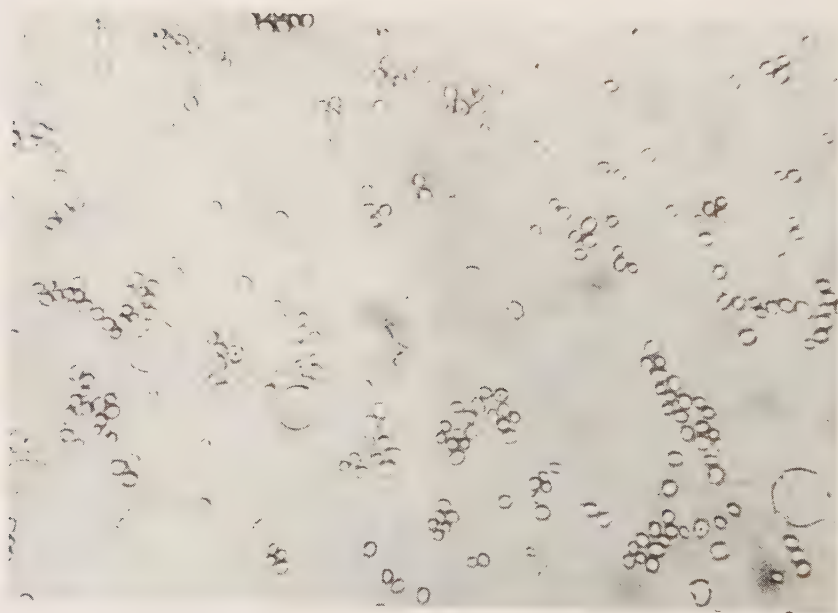


Abbildung 12: Charge F (1 : 500)

IV. DISKUSSION

Die Brauchbarkeit eines Zy-Präparates wird im allgemeinen danach beurteilt, ob es zur Herstellung von RP- und R_3 -Seren sowie zur Bestimmung von Serumproperdin geeignet ist.

Zweifellos müssen diese Fähigkeiten ein Korrelat in der chemischen Zusammensetzung und der Feinstruktur des Zy haben. Diese Eigenschaften sind wiederum abhängig von den Ausgangsmaterialien und von der Herstellungsart. Für unsere Zymosane konnten wir bezüglich beider Faktoren keine näheren Angaben von den betreffenden Firmen erhalten. Es ist lediglich bekannt, daß das Zymosan der Firma Fleischmann aus *Saccharomyces cerevisiae* hergestellt wird. Daß es verschiedene Aufbereitungsverfahren von Hefe gibt, wurde bereits erwähnt (s.a. 29, 47, 51, 52).

Bei Durchsicht der bisher vorliegenden Literatur scheint es, als ob nur die qualitative, nicht jedoch die quantitative chemische Zusammensetzung des Zy einen Einfluß auf seine serologische Reaktivität hat - sieht man einmal von den nach starker unphysiologischer pH-Verschiebung entstehenden Veränderungen (29) ab. Aus der Herstellungsart und den Ergebnissen einer mikrochemischen Analyse wird man trotzdem nicht auf die serologischen Eigenschaften eines Zy schließen können: DI CARLO und FIORE (7) fanden gleiche chemische Zusammensetzung der Zymosane A und B von Fleischmann (s. Analysentabelle S.6); beide Präparationen unterscheiden sich jedoch in ihrem Verhalten gegen P und C'_3 ; und die quantitativ gänzlich verschieden zusammengesetzten Zymosane von SCEVOLA (52), die einem tryptischen Verdauungsvorgang bzw. einer Hydrolyse mit Pyridin entstammen, zeigten gleich gute praktische Brauchbarkeit. Schließlich sei in diesem Zusammenhang noch auf die diversen chemisch untereinander sehr differenten Polysaccharide hingewiesen, die P zu binden vermögen (46).

Vergleicht man die Brauchbarkeit der von uns getesteten Zymosane mit der Morphe ihrer Teilchen, wie sie im Serum suspendiert vorliegen, so läßt sich sagen, daß die Präparationen, die eine homogene Verteilung von Partikeln ähnlicher Größe liefern (B und F), zur PZ-Bildung, C'_3 -Inaktivierung und P-Bestimmung geeignet sind. Hingegen inaktivierten sie in unseren Versuchen nach zweimaliger Inkubation bei 17°C soviel C'_3 , daß das entstandene RP-Serum unbrauchbar wurde. Von anderer Seite wurde jedoch berichtet, daß sowohl Zy F (29) als auch Zy B (15) nach zweimaliger Inkubation (von je ca. 60 min bei 15°C) ein brauchbares RP lieferten. Die genannten

Autoren hatten jedoch das Zy vor der Verwendung "aktiviert", d.h. homogenisiert, in H₂O oder NaCl gekocht, abzentrifugiert und dann in Puffer suspendiert.

Hingegen erwiesen sich die Präparationen, die im Serum inhomogen suspendiert vorlagen und gänzlich unterschiedliche Partikelgröße zeigten (insgesamt aber eine kleinere Oberfläche als die homogen suspendierten Teilchen hatten), als mehr oder weniger unbrauchbar zur RP- (zweimalige Inkubation) und R₃-Herstellung sowie zur Properdin-Testung. Sie waren lediglich in der Lage, einen Komplex mit P zu bilden. Von der Ursache der Nichtverwendbarkeit der Zymosane 30 und 31 zur P-Testung war bereits die Rede.

War jedoch - wie im Falle des Zy 30, das ja demselben Herstellungsvorgang entstammte - eine derartige Zy-Präparation vor Verwendung bereits suspendiert (hier in Alkohol), was zumindest einer teilweisen "Aktivierung" gleichkam, so war ihre Wirksamkeit von der der Trocken-Zymosane verschieden: sie zeigte gute Reaktivität gegenüber P und C'₃, und es war möglich, mit ihr nach einmaliger Inkubation ein brauchbares RP herzustellen. Die spezielle Charge 30 war allerdings zur P-Testung, wie schon oben näher erläutert, nicht geeignet.

Die Bedeutung der 3 Faktoren: Homogenität, Verwendung von bereits suspendiertem Zy und Inkubationsdauer sei in folgender Tabelle (Nr.7) veranschaulicht.

Zymosan- Art	PZ	PZC' ₃	RP		P- Testung
			1 mal 1 Std.	1 mal 1 Std. + 1 mal 1/2 Std.	
homogen trocken	+	+	?) ⁺⁺)	Ø	+
homogen suspendiert ^{+))}	+	+	?) ⁺⁺)	+	+
inhomogen trocken	+	Ø	?) ⁺⁺)	Ø	(+)
inhomogen suspendiert	+	+	+	Ø	Ø

^{+))} nach Literaturangaben (15, 29)

⁺⁺⁾ bisher noch nicht untersucht

+ = geeignet Ø = ungeeignet

(+) = zu geringe Werte, daher zur P-Titration nicht geeignet.

Es erscheint unwahrscheinlich, daß dem Suspensionsmittel (NaCl, Puffer, Alkohol) entscheidende Bedeutung zukommt. Die relative Unwirksamkeit der getrockneten inhomogenen Zymosane kann erklärt werden durch:

1. unsachgemäßes Trocknen der alkoholischen Suspensionen zu Ende der Herstellung (s.a. (47)),
2. schlechtere Dispersionsfähigkeit,
3. Unterschiede in der "Grenzflächenaktivität".

Die unter 1. angeführte Ursache kann möglicherweise für das Verhalten des Zy 31 von Bedeutung sein, nicht jedoch für diejenigen Zymosane, die nach "Aktivierung" voll wirksam werden, wie z.B. Zy B und F. Der zweitgenannten Ursache kommt in unseren Versuchen sicher keine entscheidende Bedeutung zu, da Zy 30 ebenfalls nicht feiner dispers in der Suspension ist als Zy 31. Auch die Größe der Oberfläche eines Zy dürfte nicht maßgeblich sein: Zy F hatte eine geringere Gesamtoberfläche als Zy B und lieferte doch höhere P-Titer.

Es bleibt demnach die Erklärungsmöglichkeit einer "Inaktivität" der Grenzflächen. Von den meisten Autoren wird aus diesem Grunde vor der Verwendung eine sog. "Aktivierung" der Zy-Trockensubstanz vorgeschlagen (s.o.). SCHMIDT (55) begründet diese Maßnahme damit, daß Zy-Trockensubstanz "bei der Aufbewahrung gewisse Grenzflächeneigenschaften einbüßt".

Wir haben aus folgenden Gründen keine Aktivierung unserer Präparationen vorgenommen:

1. Bei sämtlichen Chargen hatten wir es mit fabrikneuen Präparationen zu tun; der Effekt einer Lagerung kann also nur minimal sein.
2. Aus früheren Versuchen aus dem hiesigen Institut (17) war die Brauchbarkeit des trockenen B-Zy, das ohne vorherige Aktivierung zum Versuch im Serum suspendiert wurde, bekannt. Nach Mitteilung der Firma Zyma-Blaes waren die Präparationen 17, 19, 30 und 31 von der Firma aktiviert worden. Insofern konnten wir mit einer gewissen Berechtigung auf die Aktivierung verzichten.
3. Den Herstellern und uns lag daran, etwaige Wirkungs differenzen zwischen getrocknetem und bereits suspendiertem Zy zu ermitteln. In früheren Versuchen (18) wurde eine Präparation der Firma Zyma-Blaes vor Gebrauch aktiviert, d.h. in NaCl suspendiert. Sie erweist sich in jeder Hinsicht als aktiv und der Charge 30 noch darin überlegen, daß man mit ihrer Hilfe P-Titrationen ohne weiteres ausführen konnte.

Ohne aus unseren Untersuchungsergebnissen überwertige Schlüsse ziehen zu wollen, können wir sagen, daß die Aktivierung von Zy in jedem Fall für die Herstellung von RP-Seren, bei inhomogen vorliegenden Zymosan-Präparationen auch für die R_3 -Herstellung und die P-Titration - selbst bei fabrikneuen Zymosanen - notwendig ist. Das alleinige Suspendieren während des Versuchs (bei der R-Seren-Herstellung bzw. bei der P-Titration) scheint nicht in allen Fällen zu genügen.

Bei der Prüfung eines Zy hatten andere Autoren (29, 47) stets die geringste Menge Zy zu ermitteln versucht, die P bzw. C'_3 völlig aus dem Originalserum entfernte. Wenn wir diesem Vorgehen nicht folgten, so geschah dies deshalb, weil wir die in praxi üblichen Zy-Mengen zugrunde legen wollten, da es sich um die Prüfung der praktischen Verwendbarkeit der Zymosane handelte. Im übrigen sind, wie die nachfolgende Tabelle 8 zeigt, die entsprechenden Angaben trotz Verwendung unterschiedlicher Zymosane vielfach gleich (Mengen in mg/ml Serum):

Zymosan	Autor	RP	R_3	P-Titration
E	PILLEMER et al. (47)	2-3	1-3	4-8-12
B	FRITZSCHE et al. (15)	?	2-3	8
E	DRESSLER (9)	3	2	8
F	ISLIKER und LINDER (29)	2	1-2	10
E	WILLERS et al. (66)	2	3	10
F	MAASSEN (37)	15	15	10
	wir	2	2	10

E = Eigenpräparat

BLUM und Mitarbeiter (5 a) geben an, daß man nur 1/20 der oben angegebenen Menge an Fleischmann-Zy benötigt, um P aus einem Serum zu entfernen. Nach MAASSEN (37) tritt ab 15 mg Zy/ml Serum leicht eine Hemmung der C'_3 -Inaktivierung ein. -

Zum Schluß soll noch ein Vergleich unserer Titrationsergebnisse mit denen anderer Autoren vorgenommen werden. Streng genommen ist dieser nur zulässig gegenüber Werten, die für das "available properdin" ermittelt wurden; solche sind bisher nur von WILLERS und Mitarbeitern (66) und von v. GRAEVENITZ (17) veröffentlicht worden.

Zunächst muß berücksichtigt werden, daß wir mit 3 verschiedenen Zy-Prä-

parationen unterschiedliche Ergebnisse erhielten. Wir ließen kein Standardserum mitlaufen, da dessen Wert durch die Tatsache, daß sein P-Gehalt ja ebenfalls nur mit einem bestimmten Zy bestimmt wurde, eingeschränkt war⁴⁾. Trotzdem haben wir den Eindruck, daß die mit Zy 17 gewonnenen Werte zu gering sind. Dieser Eindruck wird durch die Angaben über die "total properdin"-Titer anderer Autoren, die zwischen 2 und 20 E liegen (9, 15, 17, 29, 32, 49, 66), verstärkt. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß v. GRAEVENITZ (17) bei seinen Versuchen mit Zy B nur Verdünnungsreihen bis 1 : 16 pipettiert hat, ließ sich nach einer Korrektur unserer Werte auf die entsprechende Vergleichsbasis keine signifikante Differenz der mit Zy 19 und B gewonnenen Resultate zu seinen erkennen, ebenfalls nicht zu denen von WILLERS und Mitarbeitern (66), die allerdings ein selbsthergestelltes Zy verwendeten.

Da nicht anzunehmen ist, daß überoptimale Mengen an Zy F, die höchstens eine Hemmung der C₃-Inaktivierung bewirkt hätten (37), für die mit seiner Hilfe ermittelten P-Titer verantwortlich waren, bleibt zu diskutieren, ob eine "Aktivierung" dieses Zy zu anderen, möglicherweise geringeren Werten geführt hätte.

Ferner ist zu erwägen, ob die Unwirksamkeit einiger Präparationen nicht durch Verwendung zu geringer Mengen Zy bedingt war. Wir müssen jedoch hier auf den Zweck unserer Untersuchungen verweisen, nämlich den der praktischen Verwendbarkeit und des Vergleichs mit bekannten wirksamen Chargen.

Man sollte also bei Anwendung der Zy-Methode die Tatsache im Auge behalten, daß die Angabe der Höhe eines P-Titers auch von dem dazu benutzten Zy abhängt, selbst dann, wenn sog. optimale Mengen von Zy verwendet werden. Möglicherweise liegen auch hier einige Ursachen für die differierenden Titerhöhen, die verschiedene Laboratorien bei Verwendung gleicher Technik innerhalb derselben Species fanden. Man wird also den Wert quantitativer P-Bestimmungen mehr in vergleichenden Untersuchungen sehen, sofern sie mit derselben Technik in einem Laboratorium durchgeführt werden (21).

⁴⁾ Auch ein Standardserum, dessen P-Gehalt mittels einer anderen Methode festgestellt wurde, kam hierfür nicht in Betracht, da sein Titer, selbst wenn er regelrecht bestimmt ist, durchaus keine Korrelation zu dem mit dem Zy-Verfahren bestimmten haben muß (34 a).

V. ZUSAMMENFASSUNG

Es wird über die vergleichende Prüfung verschiedener Zymosan-Präparationen für die Properdin-Bestimmung berichtet. 6 Zymosan-Chargen wurden auf folgende Eigenschaften geprüft: pH-Wert, Bakteriengehalt, antikomplementäre Aktivität, Korngrößenverteilung in Serumsuspension, Eignung für die Herstellung von RP- und R₃-Seren und für die Bestimmung der Titerhöhe des "available properdin".

Es ergab sich eine Abhängigkeit der Aktivität von dem Homogenitätsgrad und der Teilchengröße in der Suspension sowie von einer vor der Verwendung stattgefundenen "Aktivierung". Die ermittelten Ergebnisse wurden statistisch analysiert, auf ihre Signifikanz geprüft und diskutiert.

VI. LITERATUR

1. ALSEVER, J. B. and B. R. AINSLEY: New method for preparation of dilute blood plasma and operation of complete transfusion service. *N. Y. St. J. Med.* 41, 126 (1941), zit. (55).
2. BARLOW, J. L., L. LEVINE and H. van VUNAKIS: Bacteriophage neutralization as assay of properdin levels in fresh serum. *Fed. Proc.* 16, 405 (1957).
3. BIANCHI, V., G. GHIRARDO e M. SANGUINATI: Properdin determinations in human sera. *Acta haemat.* 21, 295 (1959).
- 4a. BLATTBERG, B.: Increase of bactericidal activity as a result of injection of zymosan. *Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y.* 92, 745 (1956).
- 4b. BLATTBERG, B.: Antigenicity of zymosan. *Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y.* 96, 81 (1957).
- 5a. BLUM, L., L. PILLEMER and J. H. LEPOW: XI. Studies on the interaction of zymosan with the properdin system. *Z. Immunforsch.* 118, 313 (1959).
- 5b. BLUM, L., L. PILLEMER and J. H. LEPOW: XIII. Assay and properties of heatlabile serum factor (factor B) in the properdin system. *Z. Immunforsch.* 118, 349 (1959).
6. BÜSING, K. H.: Die Beeinflussung des Properdin-Spiegels durch Extrakte aus *Echinacea pupurea* bei Kaninchen. *Z. Immunforsch.* 115, 169 (1958).
7. DI CARLO, F. J. and J. V. FIORE: On the composition of zymosan. *Science* 127, 756 (1956).
8. CARLSON, S.: Begriff und Wesen des Properdinsystems im Rahmen der unspezifischen Infektabwehr des Organismus. *Med. Welt* 4, 200 (1960).
9. DRESSLER, O.: Immunochemische Studien über das Properdinsystem. 1. Quantitative Bestimmung des Properdins im Humanserum; 2. im Mäuseserum; 3. im Meerschweinchen- und Schweineserum; 4. im Rattenserum. *Z. Immunforsch.* 117, 450 (1959).
10. EICHENBERGER, E. und H. ISLIKER: Das Verhalten des Properdins nach intravenöser Injektion bakterieller Lipopolysaccharide beim Menschen. *Helv. physiol. pharmacol. Acta* 14, C 64 (1956).
11. FINKELSTEIN, R. A., R. ALLEN and E. SULKIN: Inhibition of herpes simplex virus by normal serum: its relationship to the properdin system. *J. infect. Dis.* 104, 184 (1959).

12. FISCHER, H., H. BRÜCKNER, W. FRITZSCHE und H. BECKER: Entzündliche Reize und Reizantworten. Über das Verhalten von Fibrinolyse, Komplement- und Properdinaktivität bei der vegetativen Gesamtumschaltung. *Verh. Dtsch. Ges. Med.* 62, 324 (1956).
13. FRANK, E. D., J. FINE and L. PILLEMER: Serum properdin levels in hemorrhagic shock. *Proc. Soc. exp. Biol. N. Y.* 89, 223 (1955).
14. FRITZSCHE, W.: Das Verhalten von Komplement und Properdin beim experimentellen Peptonschock. VI. Kongreß, Europ. Soc. Hematology (Kopenhagen 1957). *Berichte*, p. 202.
15. FRITZSCHE, W., H. FISCHER, G. SCHWICK und H. E. SCHULTZE: Über die Bestimmung von Properdin und Komplementfaktoren. *Klin. Wschr.* 36, 100 (1958).
16. FUMAROLA, D.: Experimental and clinical researches on the properdin-system. *Z. ImmunForsch.* 118, 302 (1959).
17. von GRAEVENITZ, A.: Zur Bestimmung des sogenannten "available properdin" im menschlichen Serum. *Ärztl. Forsch.* 14, 134 (1960).
18. von GRAEVENITZ, A. und K. H. HUSMANN: Die Beeinflussung der Serumproperdin-Aktivität durch unspezifische Reiztherapeutica im Tierexperiment. *Arzneimittelforsch.* 10, 184 (1960).
19. GRÖNROOS, P.: The action of properdin on toxoplasma gondii. *Ann. Med. Exper. Biol. Fenn.* 33, 310 (1955).
20. HEGEDÜS, A. und H. GREINER: Quantitative Bestimmung der Komplementbestandteile. *Z. ImmunForsch.* 92, 1 (1938).
21. HEYMANN, G.: Das Properdinsystem und seine Beziehungen zur Immunität und zur Abwehrlage des Organismus. *Zbl. Bakt. I Ref.* 176, 305 (1960).
22. HINZ, C. F. jr.: Properdin levels in infectious and noninfectious disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 66, 268 (1956).
23. HINZ, C. F. jr., W. S. JORDAN jr. and L. PILLEMER: The properdin system and immunity. IV. The hemolysis of erythrocytes from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J. clin. Invest.* 35, 453 (1956).
24. HINZ, C. F. jr., J. ABRAHAM and L. PILLEMER: Requirement for properdin in hemolysis of human erythrocytes treated with tannic acid. *Proc. Soc. exp. Biol. N. Y.* 94, 230 (1957).
- 25a. HUSMANN, K. H.: Neues über unspezifische Resistenz gegen Infektionen. *Ärztl. Praxis* X, Nr. 38, 881 und 895-896 (1958).

- 25b. HUSMANN, K. H. : Experimenteller Beitrag zum Problem der Inaktivierung von Bakteriophagen durch das Properdinsystem.
Z. Hyg. Infektr. 146, 89 (1959).
- 25c. HUSMANN, K. H., A. von GRAEVENITZ und A. SPUDAS: Das Verhalten des Serumproperdins unter Einfluß von Wein, Aethylalkohol und schwefliger Säure.
Die Weinwissenschaft (Beilage zur Fachzeitschrift "Der Deutsche Weinbau"), 14, 2 (1960).
26. ISLIKER, H. C., S. BARANDUN und H. FLÜCKIGER: Mechanismen der Properdininaktivierung. Helv. physiol. pharmacol. Acta 16, C 20 (1958).
27. ISLIKER, H. C. und E. LINDER: Zur Darstellung eines bakteriziden Serumeiweißes (Properdin). Helv. physiol. pharmacol. Acta 14, C 34 (1956).
28. ISLIKER, H. C. : Unspezifische humorale Abwehrmechanismen.
Schweiz. med. Wschr. 88, 127 (1958).
29. ISLIKER, H. C. and E. LINDER: Methods for the assay of properdin.
Vox sang. 3, 23 (1958).
30. JANCZURA, E. : Study on properdin levels in infectious diseases and in over-all body irradiation. VII. Internat. Congr. Microbiol. Stockholm, 1958, Abstracts, S. 174.
31. KABAT, E. A. and M. M. MAYER: Experimental Immunochemistry.
C. C. Thomas, Springfield, Ill., 1948, zit. (29).
32. KENT, I. F., A. J. TOUSSAINT and W. A. HOOK: Adaption of the zymosan-assay of properdin to animal sera.
Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y. 96, 676 (1957).
33. LANDY, M. and L. PILLEMER: Elevation of properdin levels in mice following administration of bacterial lipopolysaccharides.
Fed. Proc. 15, 598 (1956).
34. LANDY, M. and L. PILLEMER: Increased resistance to infection and accompanying alteration in properdin levels following administration of bacterial lipopolysaccharides.
J. exp. Med. 104, 383 (1956).
- 34a. LAURELL, A.-B. and A. REYN: Comparison between properdin titers obtained in the zymosan assay and in the bacteriophage neutralization assay. I. Investigation on normal human sera.
II. Investigation on pathological sera.
Acta path. microbiol. Scand. 47, 405 u. 419 (1959).

35. LEON, M. A. : Quantitative studies on the properdin-complement system.
 - a) I. J.exp. Med. 103, 285 (1956).
 - b) II. J.exp. Med. 105, 403 (1957).
 - c) Quantitative studies of the properdin-zymosan-complex.
Transact. 6th Congr. Europ. Soc. Hemat. 1957, Abstracts No. 291.
36. LEPOW, J. H. : Studies on the activation of a proesterase associated with partially purified first component of human complement. J.exp. Med. 107, 451 (1958).
37. MAASSEN, W. : Das Properdinsystem. I. Eine Modifikation zur Messung von Properdin im Serum. Z. ImmunForsch. 119, 405 (1960).
38. NANNI, G. : Opsonic activity of properdin. Experientia 14, 23 (1958).
39. McNALL, E. G. : Assay of properdin in biological fluids. Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y. 94, 399 (1957).
40. NORTHCOTE, D. H. : Polysaccharides of the yeast cell wall. J. gen. Microbiol. 11, VII (1954).
41. PALM, J. E. : The use of zymosan in explorations for optimum conditioning of rats for human tumor transplantation in an experimental chemotherapy. Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 2, 138 (1956).
42. PENSKY, J., L. WURZ, L. PILLEMER and I. H. LEPOW: The properdin system and immunity. XII. Assay, properties and purification of a hydrazine-sensitive serum factor (factor A) in the properdin system. Z. ImmunForsch. 118, 329 (1959).
43. PILLEMER, L. and E. E. ECKER: Anticomplementary factor in fresh yeast. J. biol. Chem. 137, 139 (1941), zit. (2).
44. PILLEMER, L., L. BLUM, I. H. LEPOW, O. A. ROSS, E. W. TODD and A. C. WARDLAW: The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of a new serumprotein, properdin, and its role in immune phenomena. Science 120, 279 (1954).
45. PILLERMER, L. and O. A. ROSS: Alteration in serum properdin levels following injections of zymosan. Science 121, 732 (1955).
46. PILLERMER, L., M. D. SCHOENBERG, L. BLUM and E. TODD: The properdin system and immunity. II. Interaction of the properdin system with polysaccharides. Science 122, 545 (1955).
47. PILLEMER, L., L. BLUM, I. H. LEPOW, L. WURZ and E. TODD: The properdin system and immunity. III. The zymosan assay of properdin. J.exp. Med. 103, 1 (1956).

48. ROSS, O. A.: Experimental studies of the in vivo relationships of the properdin system to resistance to infection.
Amer. J. Path. 34, 471 (1958).
49. ROTTINO, A. and A. L. LEVY: Serum properdin levels in patients with Hodgkins disease and carcinoma. Cancer 10, 877 (1957).
50. ROWLEY, D.:
 - a) Stimulation of natural immunity to E.coli-infection. (Observations in mice). Lancet 232, 1955.
 - b) Rapidly induced changes in the level of non-specific immunity in laboratory animals.
Brit. J. exp. Path. 37, 223 (1956).
 - c) The basis for lipopolysaccharides induced non-specific immunity. Trans. 6th Congr. Europ. Soc. Hemat. 1957.
51. RZUCIDLO, L.: Chemical and biological properties of cellwalls of yeasts and yeast-like fungi.
Bull. Acad. Pol. Sci. 152, 12 (1956), zit. (66).
52. SCEVOLA, M. E.: Sulla preparazione e caratteristiche di un fattore anticomplementare presente nel lievito (Zymosan).
Boll. Soc. ital. biol. sper. 33, 179 (1957).
53. SCHEIFFARTH, F., W. FRENGER und H. GÖTZ: Immunoelktrophoretische Studien am Properdin-Zymosan- und Properdin-Inulin-Komplex. Klin. Wschr. 36, 367 (1958).
54. SCHEIFFARTH, F., W. FRENGER und R. RINGELMANN: Eine quantitative Methode der Serumproperdinbestimmung mit Inulin. Klin. Waschr. 38, 291 (1960).
55. SCHMIDT, H.: Das Properdin. Fortschritte der Immunitätsforschung, Band 2. (D. Steinkopff, Darmstadt 1959).
56. SCHULTZE, H. E. und G. SCHWICK: Das Properdinproblem. Blut 4, 280 (1958).
57. SKINNER, D. G.: The Light extinction method of particle size analysis. Inst. of Chem. Engineers, London 1947. (Zit. nach Gebrauchsanweisung zum Sedimentationszusatz für Photometer "Eppendorf").
58. SOULIER, J. P. et D. MÉNACHÉ: Variations pathologiques du complément et de la properdine chez l'homme. Acta haemat. 20, 260 (1958).
59. TELLE, O.: Korngrößenverteilungsanalyse an Pulvern und Stäuben mit einem lichtelektrischen Verfahren.
Tonind.-Ztg. 76, 369 (1952).

60. van VUNAKIS, H., I. L. BARLOW and L. LEVINE: E.coli phage inactivation by the properdin system in vitro.
Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 42, 391 (1956).
61. WARLAW, A. C., L. BLUM and L. PILLEMER: The bactericidal activity of the properdin system. Fed. Proc. 14, 480 (1955).
62. WARLAW, A. C. and L. PILLEMER: The properdin system and immunity. V. The bactericidal activity of the properdin system.
J. Exper. Med. 103, 533 (1956).
63. WARLAW, A. C. and L. PILLEMER: Inhibition of the bactericidal activity of the properdin system by zymosan and other properdin-binding agents. J. Immunol. 82, 313 (1959).
64. WEDGWOOD, R. J., H. S. GINSBERG, R. H. SEIBERT and L. PILLEMER: The properdin system and immunity. VI. The Inactivation of Newcastle disease-virus by the properdin system.
J. Exp. Med. 104, 107 (1956).
65. WESTPHAL, O., O. LÜDERITZ und F. BISTER: Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser.
Z. Naturforsch. 7b, 148 (1952).
66. WILLERS, J. M. N., K. W. PONDMAN and K. C. WINKLER: An improved properdin titration, based on the elimination of an inhibitor.
Vox sang. 4, 21 (1959).
67. WRIGHT, A. C. and S. R. DOUGLAS: An experimental investigation of the role of the blood fluids in connection with phagocytosis.
Proc. Roy. Soc. (London) 72, 357 (1903).
68. ZANUSSI, C., P. TASCHINI, G. SELVA e C. ORTOLANI: Validità e limiti del dosaggio properdina serica mediante Zymosan.
Boll. ist. sieroter. milan. 37, 237 (1958).

Herrn Professor Dr. K l i e w e und seinen Assistenten, den Herren
Dr. H u s m a n n und Dr. v o n G r a e v e n i t z, bin ich für die
Überlassung des Themas sehr zu Dank verpflichtet.

Herrn G l ü c k e r t danke ich für seine bereitwillige Unter-
stützung in phototechnischen Fragen.

LEBENS LAUF

Am 19. Juni 1934 wurde ich, Klaus Christian Hoebbel, als Sohn der Eheleute Friedrich Christian Hoebbel und Erna Luise, geb. Löh, zu Herrstein im Kreis Birkenfeld/Rheinland geboren.

Nach fünfjähriger Grundschule (1941-1946) trat ich 1946 in die Sexta des Staatl. Naturwissensch. Gymnasiums in Idar-Oberstein/Nahe ein, wo ich auch im Februar 1955 die Reifeprüfung ablegte.

Anschließend war ich bei der Allg. Ortskrankenkasse in Idar-Oberstein tätig.

Im Wintersemester 1955/56 begann ich an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz mit dem Studium der Medizin. Dort bestand ich auch im Sommer 1958 die ärztliche Vorprüfung (Physikum). Das Studium der klinischen Semester setzte ich an der gleichen Universität fort, wo ich es auch 1961 mit der ärztlichen Prüfung abschließen will.

